

Masteroppgave i toksikologi ved Biologisk institutt

Ekspresjon av *Mdig* genet i lungekreft

Elín Einarsdóttir Thornér

Biologisk institutt

Det matematisk - naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO 03/2009



Forord

Dette arbeidet ble utført ved Toksikologisk gruppe på Statens arbeidsmiljøinstitutt (STAMI) som en del av mastergraden ved Universitet i Oslo. Faglig hovedveileder har vært seniorforsker Shanbeh Zienolddiny, Toksikologisk gruppe, STAMI. Internveileder har vært professor Steinar Øvrebø ved Biologisk institutt, Universitet i Oslo.

Jeg vil først og fremst takke min veileder seniorforsker Shanbeh Zienolddiny for god faglig veiledning og stor tålmodighet. Hans evne og vilje til å formidle kunnskap, og generelt positiv holdning, gjorde arbeidet med oppgaven givende og lærerikt. Jeg ønsker også å takke professor Steinar Øvrebø for gode faglige råd, og Åge Haugen som gav meg muligheten til å utføre oppgaven på STAMI. Jeg vil videre takke Vidar Skaug for faglige råd og hans bidrag til mikroskoperingen.

Jeg vil rette en spesial takk til Nina Landvik og Monica Solbakken for at dere har vært hjelpsomme og støttet meg. Dere har gitt gode råd, både teoretisk og eksperimentelt. Dere har bidratt til å gjøre studietiden både morsom og innholdsrik.

Jeg vil takke Petter Kristensen for hjelp med forståelsen av statistikk.

Jeg vil takke Merete Hersson og Marit Skogstad for korrektur lesing og mange gode diskusjoner som jeg har satt stor pris på. Videre vil jeg takke Tove Andreassen som også har tatt seg tid å lese oppgaven min og kommet med gode råd. Jeg vil også rette en takk til de andre på gruppen min Kristine Haugen, Kent Hart og Hanne Karlsen dere har vært imøtekommende og hjelpsomme. Jeg vil takke mine venner som har støttet meg og holdt ut med meg i stressende perioder.

En stor takk til min mor som har lært meg at det er aldri for sent å tilegne seg nye kunnskaper.

Til slutt vil jeg takke min familie, min mann Peter og mine barn Frida Märta og Carl-Einar for at dere har troen på meg, og støttet meg under denne tiden. Dere er alt for meg.

Sammendrag

Human mineral dust-induced gen (*Mdig*), også kalt *Mina53*, ble nylig karakterisert. Det ble vist at genet induseres av mineralstøv (kvarts partikler) i lungene hos gruvearbeidere. Videre ble det funnet økt uttrykk av *Mdig* proteinet i lungesvulster fra lungekreftpasienter, men ikke i normalt lungevev. Kreftceller isolert fra lungesvulster viste også økt uttrykk av *Mdig* genet. Dessuten viste det seg at noen lungekreftceller manglet ekson 2 av genet. Disse funnene tyder på at *Mdig* genet er viktig i lungekreftutvikling og er en interessant kandidat å studere videre.

I denne oppgaven har uttrykket av *Mdig* proteinet i lungesvulster, isolert fra norske lungekreftpasienter som er blitt operert for lungekreft, blitt studert. Videre ble det studert om genvariasjoner i *Mdig* kan påvirke risikoen for å utvikle lungekreft. Det ble benyttet metoder som TaqMan genotyping, PCR og immunhistokjemi (IHC).

I dette lungekreftmaterialet hadde kvinner høyere forekomst av adenokarsinomer, mens plateepitelkarsinomer var mer frekvent hos menn. Kvinner med adenokarsinomer var signifikant eldre enn kvinner med storcellet karsinom. Det ble vist at plateepitelkarsinom og storcellet karsinom er sterkere assosiert med røyking enn adenokarsinom noe som bekrefter tidligere funn fra andre studier.

Det ble observert at *Mdig* proteinet var uttrykt hos 80,4 % av lungekreftpasienter på areal, og i fargeintensitet er det 92,5 % som er positive. Lungekreftcellene viste i blant varierende fargeintensitet i samme tumor som kan tyde på ulik aktivitet i cellene. Det kan være at areal korrelerer bedre med ekspresjon av *Mdig* genet enn fargeintensitet. Det var ingen signifikante forskjeller mellom de ulike kreftformene på fargeintensitet og areal. Med hensyn på røyking uttrykte ikke-røykere mer *Mdig* protein enn røykere. Imidlertid er det svært få ikke-røykere i dette materialet og derfor vanskelig å trekke noen konklusjon. Resultatene i IHC tyder på at *Mdig* er en proliferasjonsmarkør i lungekreft og i tillegg har en aktiv rolle i kreftutviklingen.

Ved genotypingen ble det ikke funnet signifikante assosiasjoner mellom genvarianter av *Mdig* som ble analysert og lungekreft. Videre *Mdig* uttrykk i lungesvulster ble ikke påvirket av genvariasjoner i *Mdig* genet.

Forkortelser

A	Adenin
AM	Alveolær makrofag
ATP	Adenosintrifosfat
B(a)P	Benzo(a)pyren
bp	Basepar
C	Cytosin
CAT	Katalase
Cdk	Cyklin-avhengig kinase
DAB	3, 3-diaminobenzidin
cDNA	Komplementært DNA
DNA	Deoksyribonukleinsyre
dNTP	Deoksynukleotidtrifosfat (dATP, dGTP, dCTP og dTTP)
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
G	Guanin
G1	Gap 1 fase
G2	Gap 2 fase
GPO	Glutation peroksidase
GST	Glutationtransferaser
GSH	Glutation
Histologi	Vevslære
HRP	Pepperrot peroksidase
IARC	International Agency for Research on Cancer
IHC	Immunhistokjemi
KOLS	Kronisk obstruktiv lungesykdom
M - fase	Mitosefasen
<i>Mdig</i>	Mineralstøv induisert gen
Mdig	Mineralstøv induisert protein

<i>Mina53</i>	Myc indusert nukleært antigen-53
Mina53	Myc indusert nukleært protein-53
NSCLC	Ikke-småcellet lungekreft
mRNA	Budbringer ribonukleinsyre
OR	Odds ratio
PAH	Polysykliske aromatiske hydrokarboner
PBS	Fosfatbufret saltløsning
PCR	Polymerase kjedereaksjon
RNA	Ribonukleinsyre
RNAi	RNA interferens
ROS	Reaktive oksygenarter
S - fase	Syntesefasen
SCLC	Småcellet lungekreft
SNP	Enkelnukleotid polymorfi
SOD	Superoksiddismutase
ssDNA	Enkeltrådet DNA
µg	Mikrogram
RNS	Reaktive nitrogen forbindelser
ROS	Reaktive oksygen forbindelser
RT	Revers transkripsjon
T	Tymin
TE	Tris-EDTA
TBE	Tris-borsyre-EDTA
TNF	Tumor nekrose faktor
U	Uracil
UV	Ultrafiolett

Definisjoner og betegnelser

Aneuploidi: Betegner celler med unormalt antall kromosomer. Mange kreftceller er aneuploide.

Antigen: Begrepet antigen brukes om alle forbindelser eller strukturer som er i stand til å bli gjenkjent av et antistoff. Nesten alle typer biologiske molekyler, inklusiv små enkle metabolitter, lipider og hormoner, men også makromolekyler som komplekse karbohydrater, fosfolipider, nukleinsyrer og proteiner kan fungere som antigen. [1].

Antistoff: Antistoffene er bifunksjonelle molekyler. Den ene delen er ansvarlig for binding til antigenet, mens den andre kobler antistoffet til forskjellige effektorsystemer. Antistoffet er immunforsvarets produkt. [1].

Epitop: Den delstrukturen av antigenet som antistoffet binder til kalles for en epitop eller antigen determinant. Proteiner har to forskjellige typer epitoper *konformasjonsdeterminanter* og *sekvensdeterminanter*. [1].

Fab: Armene på immunglobulinmolekylet kalles for **Fab** (**F**ragment **a**ntigen **b**inding), og er som navnet sier, ansvarlig for binding av fremmede antigen strukturer [1].

Fc: Halen på immunglobulinmolekylet kalles for **Fc** (**F**ragment **c**rystallizable) og formidler antistoffmolekyleneffektorfunksjoner, som binding av komplement, binding til Fc reseptorer på makrofager, granulocytter osv. [1].

Klon: En klon er mange av samme slag. En enkelt lymfocytt og dens identiske datterceller kalles en klon [1].

Monoklonale antistoffer: Monoklonale antistoffer (mAbs) er antistoffer der alle stammer fra samme celleklon. I motsetning til et polyklonalt Ab vil mAb utelukkende bestå av fullkomment ensartede antistoffmolekyler rettet mot en og samme epitop på antigenet [2].

Polyklonale antistoffer: Polyklonale antistoffer (pAb) produseres av ulike celler og er på den måten immunologisk ulike idet de reagerer med forskjellige epitoper på antigenet [3].

Innhold

Forord	3
Sammendrag	5
Forkortelser	6
Definisjoner og betegnelser	8
Innhold	9
1 Introduksjon	11
1.1 Lungekreft	11
1.1.1 <i>Epidemiologi</i>	11
1.1.2 <i>Risikofaktorer for lungekreft</i>	11
1.1.3 <i>Histologi</i>	12
1.2 Lungekarsinogener	13
1.3 Metabolisme av karsinogener	16
1.4 Genetisk susceptibilitet i lungekreft	17
1.5 Mekanismer av kreftutvikling	18
1.6 Cellevekst / proliferasjon	20
1.7 Apoptose	20
1.8 Inflammasjon	21
1.9 Oksidativt stress	22
1.9.1 <i>Reaktive oksygen og nitrogen forbindelser</i>	22
1.10 <i>Mdig</i> genet og Mdig proteinet	24
1.11 Målsetning med oppgaven	26
2 Metoder	28
2.1 Prøvematerialet og teknikk for IHC	28
2.2 Analyse av <i>Mdig</i> genet	31
2.2.1 <i>Polymerase Chain reaction (PCR)</i>	31
2.2.2 <i>Agarose gel elektroforese</i>	32
2.2.3 <i>Kutting med restriksjonsenzym</i>	33
2.3 Genotyping	34
2.4 Statistiske metoder	37
2.4.1 <i>P-verdier og odds ratio</i>	37
2.4.2 <i>Regresjonsanalyse</i>	38
2.4.3 <i>Chi – kvadrat test og Fisher eksakt test</i>	39
2.4.4 <i>Logistisk regresjonsanalyse</i>	39
3. Resultater	41
3.1 Immunhistokjemisk farging av tumorvev	41
3.1.1 <i>Immunhistokjemisk farging av Mdig proteinet</i>	41

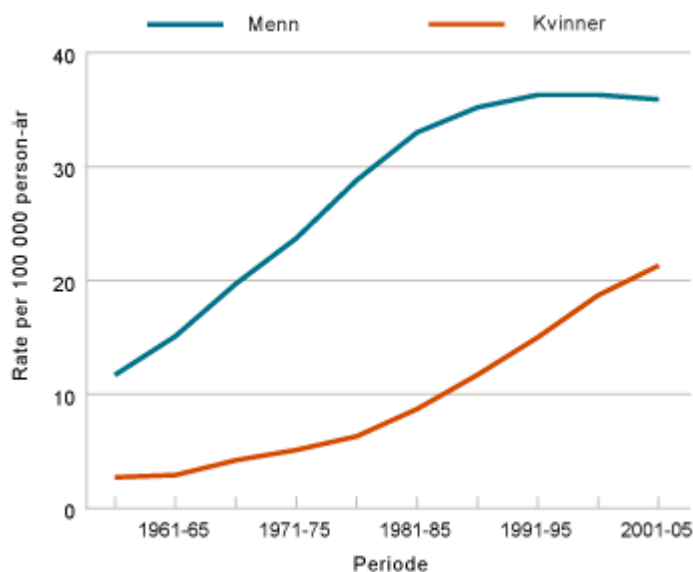
3.2	Genotyping av polymorfier i <i>Mdig</i>	51
3.2.1	<i>Genotyping av Mdig SNP rs2172257 og Mdig SNP rs699304</i>	51
3.2.2	<i>Genotyping av Mdig SNP rs2172257 med PCR</i>	55
3.2.3	<i>Lungekreft risiko forbundet med polymorfier i Mdig genet</i>	56
4.	Diskusjon	62
4.1	Diskusjon av Metodene	62
4.1.1	<i>Immunhistokjemi</i>	62
4.1.2	<i>Genotyping</i>	63
4.2	Diskusjon av Resultater	63
4.2.1	<i>Immunhistokjemi studie av Mdig proteinet</i>	63
4.2.2	<i>Lungekreft risiko forbundet med to Mdig SNPer</i>	65
5.	Konklusjon	67
6.	Referanser	68
	Vedlegg I	73
	Vedlegg II	76

1. Introduksjon

1.1 Lungekreft

1.1.1 Epidemiologi

Lungekreft er en av de vanligste kreftformene som også tar flest liv på verdensbasis. I 2002 ble 1,35 millioner mennesker diagnostisert med sykdommen og 1,18 millioner døde som en følge av den [4]. I 2007 var det i Norge 2550 tilfeller og 2007 personer døde som følge av lungekreft [5]. Sykdommen viser svært lave overlevelsestall hvor kun 10 % overlever de første 5 årene etter diagnostisering [6]. Tidligere var lungekreft vanligst blant menn, men de siste årene er forskjellen redusert. Dette skyldes, til en viss grad, et økende antall kvinnelige røykere, men studier tyder også på en økt mottagelighet for å utvikle lungekreft hos kvinner i forhold til menn [7]. Figur 1.1 viser forekomsten av lungekreft i Norge hos menn og kvinner i perioden 1956-2005.



Figur 1.1 Forekomst av lungekreft fra 1956 til 2005. Kilde: Kreftregisteret(8).

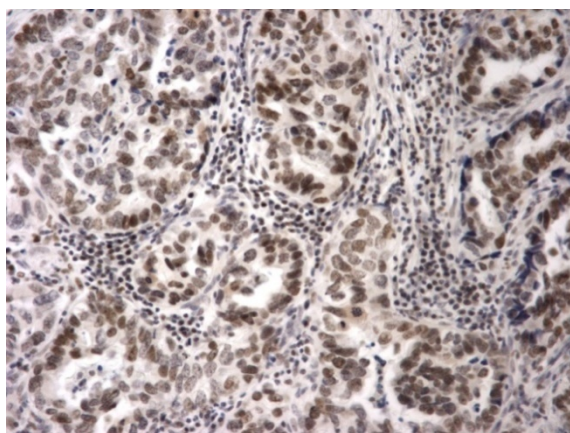
1.1.2 Risikofaktorer for lungekreft

Den største risikofaktoren for lungekreft er langtidsinhalering av kreftfremkallende stoffer. Den dominerende faktor er røyking og ca 80-90 % av lungekreftpasientene er eller har vært røykere. Arbeidsmiljørelaterte eksponeringer kan være årsaken til 10-15 % av lungekrefttilfellene [9]. Arbeidsmiljørelatert eksponering består gjerne av stoffer som: 1) polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH) fra

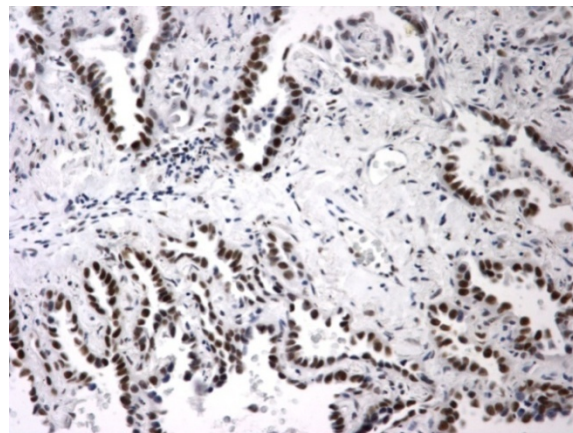
aluminiumproduksjon og koksverk [10], støv (asbest, man made mineral fibers (MMMF) og kvartsstøv), 3) nikkel og krom fra industri og byggebransjen [11, 12, 13] og 4) radoneksponering i urangruver. Andre typer eksponering som kan forårsake lungekreft er høy grad av luftforurensning og dieseleksos utendørs i byområder [14].

1.1.3 Histologi

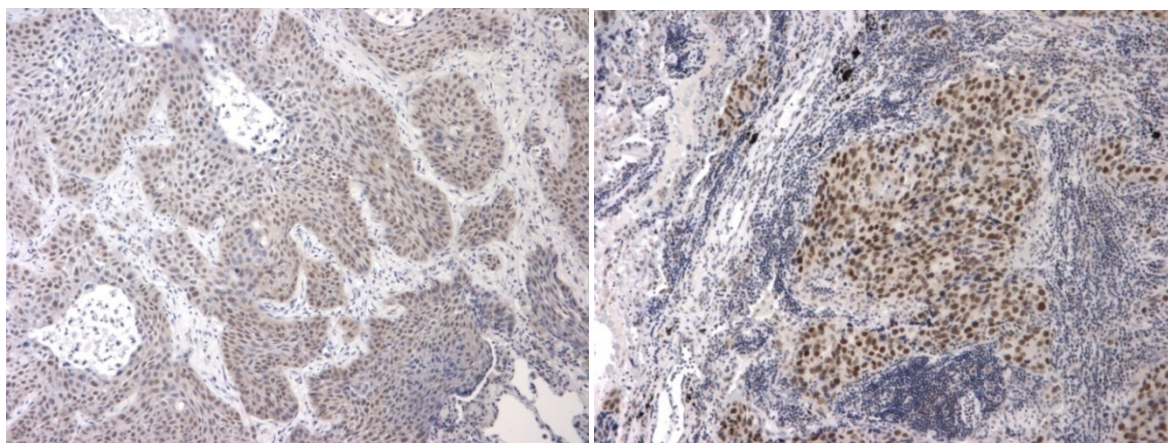
Det er to histologiske hovedtyper av lungekreft; småcellet lungekreft (SCLC = Small Cell Lung Cancer) og ikke-småcellet lungekreft (NSCLC = Non-Small Cell Lung Cancer). SCLC utgjør ca 20-25 % av tilfellene. Tumorcellene er små, deler seg raskt og det er ofte spredning til andre organer tidlig i sykdomsforløpet. NSCLC deles inn i tre undergrupper: plateepitelkarsinom, adenokarsinom og storcellet karsinom. Denne formen for lungekreft sprer seg langsommere enn SCLC. NSCLC utgjør 75-80 % av tilfellene. Plateepitelkarsinom består av tumorceller utviklet fra lungens epitelceller. Adenokarsinom utspringer fra kjertelceller eller slimproduserende celler og oppstår oftest i perifere lungevev. Kreftformen er som oftest assosiert med røyking, men blant mennesker som aldri har røkt samt kvinner er adenokarsinom den vanligste formen for lungekreft. Storcellet karsinom har store tumorceller og viser ikke noen spesifikke mikroskopiske trekk. Det er en hurtigvoksende form som utvikles nær overflaten av lungene. Den er ofte dårlig differensiert og har en tendens til å metastasere tidlig [15, 16, 17]. Figur 1.2-1.5 viser bilder av tumorvev som er tatt i forbindelse med dette prosjektet. De viser immunhistokjemiske (IHC) farginger av de ulike formene for NSCLC.



Figur 1.2 DB nr 714, adenokarsinom (fargeintensitet 3).



Figur 1.3 DB nr 440, perifer adenokarsinom (fargeintensitet 3).



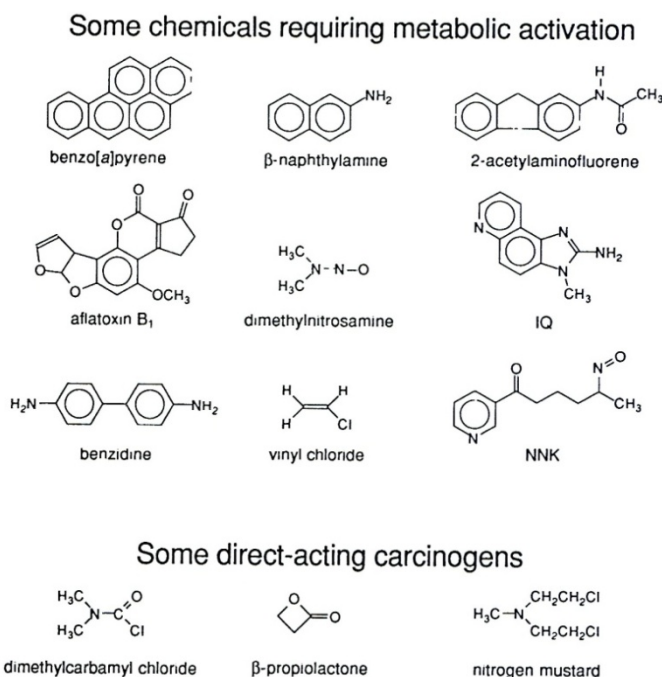
Figur 1.4 DB nr. 228, plateepitelkarsinom **Figur 1.5** DB nr. 536, storcellet karsinom
(fargeintensitet 2, forstørrelse x10). (fargeintensitet 2, forstørrelse x10).

Lungekreftgradering er en vurdering av spredningsgraden av kreftsykdommen fra dets opprinnelsessted. Gradering er en viktig faktor som virker inn på prognosen og behandlingsmulighetene. NSCLC deles inn i 4 stadier ved diagnosepunktet fra I til IV (I gir beste prognose og IV dårligst prognose). SCLC klassifiseres som "begrenset stadium" hvis den kun er lokalisert til den ene halvsiden av brysthulen og innen ett felt for strålebehandling. Ellers blir kreften betegnet som et "fremskredet stadium" [18]. Sykdomsutvikling, behandlingsopplegg og prognose er forskjellig for disse fire hovedtypene av lungekreft. Utvikling innen mikromatriseteknologien har gjort det mulig å analysere flere tusen gener samtidig. Gen ekspresjonsprofiler kan bidra til ny klassifisering av lungekreft og behandling basert på molekyler patologi [19].

1.2 Lungekarsinogener

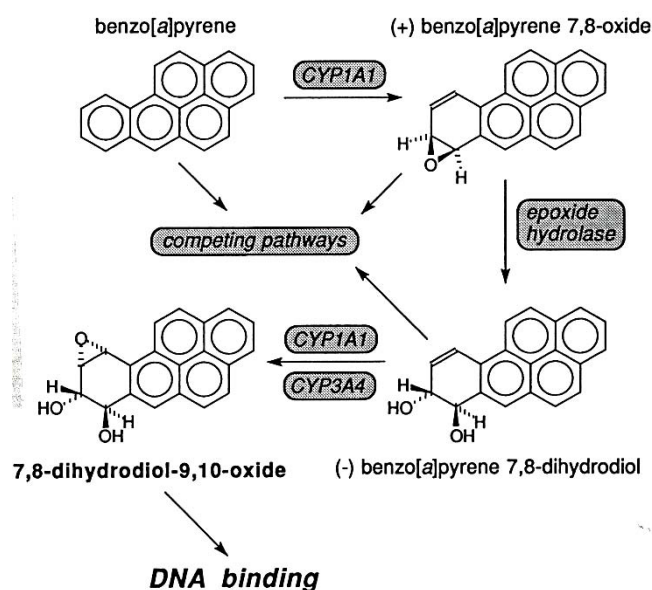
I 1764 skrev den engelske legen John Hill en artikkel om kreft i nesen hos snusbrukere. Det var den første kjente beretningen om kreft framkalt av et ytre stoff, nemlig tobakk, som kom i berøring med nesens slimhinner [20].

Kjemiske karsinogener forårsaker et større antall svulster (ca 80 % er en vanlig oppfatning) enn de som oppstår spontant eller som er arvelige [21]. Kjemiske karsinogener er klassifisert i to hovedgrupper; genotoksiske og ikke genotoksiske. Genotoksiske forbindelser fører til skade på DNA og er enten direkte eller indirekte virkende. De som virker indirekte må metaboliseres før de kan interagere med DNAet. Genotoksiske forbindelser har meget forskjellige strukturer, men alle er elektrofile. Alkylerende stoffer er genotoksiske karsinogener. Alkylering er en alvorlig kjemisk reaksjon med DNA-baser, der DNA-basene fungerer som nukleofiler, og de reaktive kjemikaliene fungerer som elektrofiler. De fleste genotoksiske karsinogener krever enzymatisk bioaktivering for å reagere med DNA molekylet. Figur 1.6 viser eksempler på noen karsinogener.



Figur 1.6 Eksempler på karsinogener. [24].

I figur 1.7 kan en se benzo(a)pyren omdannet gjennom flere forskjellige trinn, hvor P450 enzymer CYP1A1 og CYP3A4 spiller aktive roller. Det første trinnet er en epoksidering via CYP1A1 til en epoksidstruktur som omdannes via enzymet epoksidhydrolase til en diol, som igjen oksideres av CYP1A1 og CYP3A4 til en 7,8-dihydrodiol-9,10-epoksid (BPDE). BPDE er tilstrekkelig elektrofil for å gå løs på DNA [22, 23, 24].



Figur 1.7 Metabolisme av benzo(a)pyren til det ultimate karsinogenet BPDE. [24].

Det er en lang rekke kjemiske stoffer som kan føre til lungekreft og sigaretttrøyk er en viktig kilde til lungekarsinogener. Det er identifisert over 4000 kjemiske forbindelser i sigaretttrøyk og mer enn 60 er klassifisert som humane karsinogener i følge International Agency for Research on Cancer (IARC) [25]. Polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH) dannes ved ufullstendig forbrenning av organisk materiale som for eksempel tobakk. PAH utgjør en gruppe kjemiske stoffer som er strukturelt beslektet og er bygd opp av et ulikt antall benzen molekyler satt sammen i forskjellige konfigurasjoner. Et eksempel på PAH i sigaretttrøyk er benzo(a)pyren [26].

Asbest er en fiberliknende uorganisk polymer som kan gi lungekreft eller kreft i brysthinnen (malignt mesoteliom). Hvis man i tillegg til asbest eksponering røyker vil risikoen øke betraktelig [27]. Et annet viktig lungekarsinogen er radon. Radongass er kreftfremkallende fordi den kan brytes ned til ustabile forbindelser som avgir alfastråling til bronkier og lunger [28]. 1,3 butadien er et annet humant karsinogen. En sigarett inneholder ca 35,5 µg i hovedstrømsrøyken. 1,3 butadien bioaktiveres av CYP2A6 til 1,2 epoxy-3buten. 1,2 epoxy-3buten reagerer med hemoglobin og danner 1,2-hydroxy-3butenyl addukt. Dersom dette DNA addukt unnslipper reparasjons mekanisme kan det gi opphav til lungekreft [29].

Flere studier har vist økt nivå av cellulært oksidativt stress hos røykere og pasienter med kronisk obstruktiv lungesykdom (KOLS). Sigaretttrøyk

er den viktigste eksogene kilden til frie radikaler. Hvert sug av en sigarett inneholder opp til 10^{17} frie radikaler som fører til en stor oksidativ byrde i lungene. Tobakksrøyk i luftveiene medfører økt inflammatorisk respons ved å stimulere makrofager og epitelceller til å friggi transkripsjonsfaktoren NF- κ B. Denne igjen øker genekspresjonen av inflammatoriske mediatorer, som interleukin-8, leukotrien B₄, TNF- α og IL1B. Røyking stimulerer migrasjon av neutrofile granulocytter som frigir enzymet myeloperoksidase (MPO), som også kan resultere i oksidativ skade. Oksidativt stress kan også føre til epigenetiske forandringer i DNAet. Epigenetiske karsinogener forandrer ikke DNAet direkte, slik genotoksiske karsinogener gjør. Derimot virker de gjennom andre mekanismer, for eksempel ved å bestemme hvilke deler av arvestoffet som skal aktiveres ved å endre metyleringsgraden til DNAet eller endringer i kromatinstrukturen [30].

1.3 Metabolisme av karsinogener

Biotransformasjon, dvs. metabolisme av fremmedstoffer, sørger for omsetning og utskillelse av stoffer fra organismen. Dette skjer som regel ved at stoffets vannløselighet økes for å forenkle utskillelsen. Metabolitten som dannes kan i noen tilfeller være mer toksisk enn den opprinnelige forbindelsen som da er blitt bioaktivert, for eksempel benzo(a)pyren. Det antas at reaktive mellomprodukter er involvert i celledød, kjemisk indusert kreft og teratogenese.

Biotransformasjon deles inn i to typer enzymatiske reaksjoner; fase I og fase II reaksjoner. I fase I reaksjoner inngår oksidasjon, reduksjon og hydrolyse for å tilføre eller frigjøre funksjonelle grupper slik som -OH, -SH, -NH₂ og -COOH. De funksjonelle gruppene danner så utgangspunkt for fase II reaksjoner (konjugeringsreaksjoner) der kroppens egne vannløselige molekyler konjugeres (bindes) til fremmedstoffet. Produktet blir derved også mer vannløselig og kan skilles ut via nyrene/galle. Flere av enzymesystemene er induserbare, dvs. at de øker i mengde/volum ved behov. Lengre tids eksponering for visse stoffer øker aktiviteten av enzymesystemene. I praksis vil dette ofte påskynde stoffets egen og andre stoffers nedbrytning i kroppen.

Cytokrom P-450 (CYP) er de aller viktigste fase I enzymene; både de mest tallrike (mange isoenzymer) og de med bredest substratspesifisitet.

Reaksjoner med CYP gir ofte epoksider. De viktigste CYPene som er ansvarlige for PAH aktivering i lunger er CYP1A1 og CYP1B1.

Glukuronidering er en av de aller viktigste fase II reaksjoner pga det store antallet ulike substrater som aksepteres og den store diversiteten av akseptor grupper. Uridindifosfat glukuronosyltransferaser (UDPGT) er en stor klasse enzymer som katalyserer interaksjonen mellom UDP-glykuronsyre (UDP-GA) og den funksjonelle gruppen på akseptor molekylet (substratet). Enzymaktiviteten er lokalisert til det endoplasmatiske retikulumet. Membranlokaliseringen gjør at UDPGTene har direkte adgang til de produktene som dannes via CYP-systemet. Et annet eksempel for fase II enzymene er glutathiontransferaser (GST). Stoffer som er substrater for GST har tre fellestrekk: de må være hydrofobe til en viss grad, de må inneholde et elektrofilt karbonatom og de må kunne reagere ikke-enzymatisk med glutathion (GSH). GST avgifter reaktive intermediater produsert av CYP systemet.

Biprodukter fra Fase I og Fase II reaksjoner kan binde seg til basene i DNAet og danne DNA-addukter. En konsekvens av DNA-addukter kan være mutasjonsdannelse i viktige gener. Mutasjoner er en viktig forutsetning for kreftutvikling [22,31].

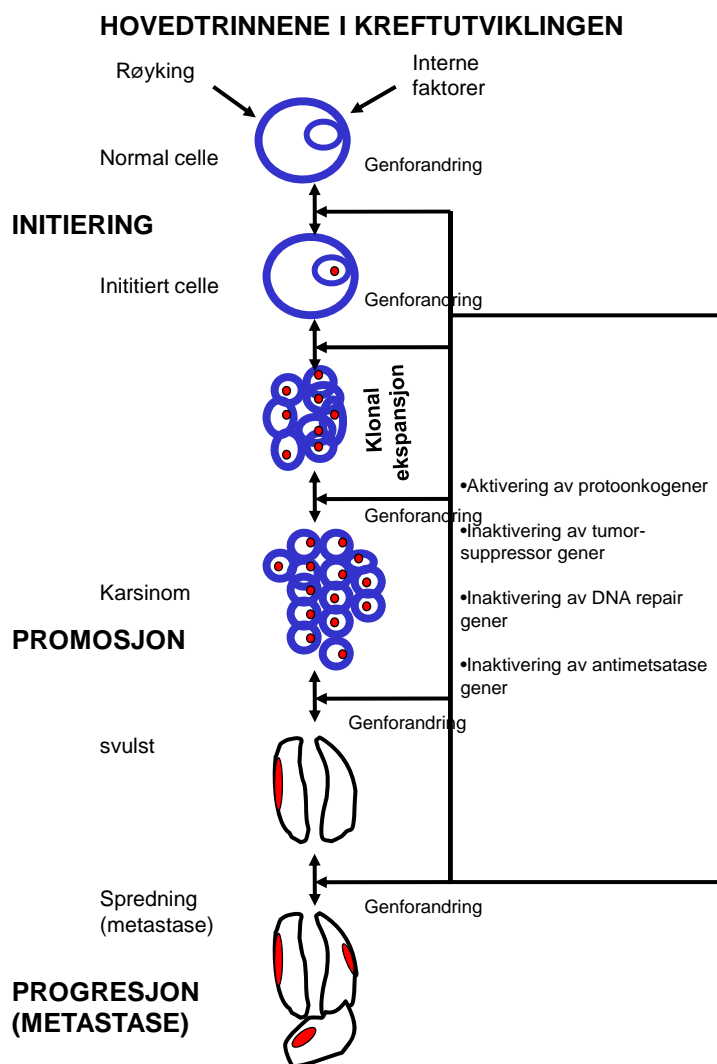
1.4 Genetisk susceptibilitet i lungekreft

Alle mennesker har den samme genetiske sammensetningen, men variasjoner i den genetiske sekvensen gjør hvert individ unikt. Lungekreft er en sykdom som er miljøbettinget og primært forårsaket av tobakksrøyking, men det er bare en liten del av alle røykere som får lungekreft, ca 10 -15 % [32]. Dette har gitt indikasjoner på at det kan foreligge en genetisk disposisjon hos de som utvikler lungekreft [33]. Årsaken kan forklares ved at noen koder genetisk for mer effektive nedbrytningsenzymer for karsinogenene i tobakk samt mindre effektive DNA reparasjonsenzymer. Det finnes en naturlig variasjon i DNAet som finnes i befolkningen. Denne type variasjon forekommer i mer enn 1 % av befolkningen og kalles for polymorfisme. De personene som muligens har "dårlige" genvarianter vil, dersom de utsettes for karsinogener, kunne utvikle lungekreft lettere enn andre. Det finnes en rekke molekylærgenetiske metoder for å påvise genvariasjoner. DNA-polymorfier kan defineres som en arvelig genetisk variasjon på et bestemt sted i genomet med en frekvens på over 1 % i befolkningen. Den består av

en enkel nukleotid polymorfi av en base til en annen (for eksempel en C til T). DNA-polymorfier kan også bestå av delesjoner eller insersjoner av en eller flere baser eller en variabel lengde repeterende DNA-sekvens (såkalt "variable number of tandem repeats" eller VNTR) [34]. Genetiske variasjoner i en rekke gener som er involvert i metabolisme-avgiftning av kreftfremkallende stoffer, reparasjon av DNA-addukter, celleproliferasjon og inflammasjongsener er påvist å påvirke krefttrisikoen eller prognosen for pasienter med diagnosen kreft. Det er identifisert polymorfier i mange andre sentrale gener som regulerer cellulært stress.

1.5 Mekanismer av kreftutvikling

Mekanismen bak kreftutvikling er endringer (mutasjoner) i arvestoffet som fører til ukontrollert cellevekst (proliferasjon). Det skjer stadig slike mutasjoner i cellene, men de fleste blir reparert eller fører til celledød. Når mutasjonene rammer onkogener eller tumorsupressorgener kan cellens vekstregulering komme ut av balanse. Mange kjemiske stoffer kan omdannes i kroppen til mutagener. Miljøfaktorer kan i noen tilfeller virke sammen slik at de forsterker hverandres påvirkning. Når en celle mister kontroll over sin egen cellesyklus, kan den produsere nye celler (datterceller) som organismen ikke har behov for eller som er skadet. En svulst kan være benign (godartet) eller malign (ondartet). Maligne tumorer slutter ikke å vokse og er dødelig uten behandling. Cellene i en slik svulst vokser inn i vevet (invasiv) omkring og kan derfor være vanskelig å operere. Dersom cellene fra ondartede svulster vokser inn i blodårer eller lymfeknuter/kar og følger med til andre deler av kroppen, kan de gi uhemmet vekst på andre lokalisasjoner. Dette kalles metastasering og leveutsiktene for en slik pasient er ofte dårlige. Kreftsvulster deler vi inn blant annet etter celletyper de er bygd opp av: karsinomer, sarkomer, lymfomer og leukemier. Karsinom er den mest vanlige kreftformen, den stammer fra epitelceller. De mest vanlige krefttypene av denne sorten er lunge, bryst og tarmkreft. Kreftformer som oppstår fra celler som finnes i kroppens støttevev, som bein, brusk, fett, bindevev og muskler (mesenkymale celler) kalles sarkom. Lymfom og leukemier oppstår fra immunsystemets celler kalt lymfocytter. Kreftutviklingen deles vanligvis inn i tre faser, initiering, promosjon og progresjon som er vist i figur 1.8.



Figur 1.8 Hovedtrinnene i kreftutviklingen. Modifisert etter S. Zienolddiny.

Initiering er en "stum" endring i arvematerialet som fikseres ved flere celledelinger og dermed blir irreversibel. En initiert celle har som oftest endringer i onkogener og tumorsuppressorgener. Promosjon er den prosessen som øker cellens proliferasjon. Overgangen fra promosjon til progresjon kan defineres som overgangen fra en benign celle til en malign. Progresjon er den siste fasen, er spontan samt irreversibel [24]. Eksempler på onkogener er Murine double minute-2 (*MDM2*), *RAS* og Cyclin D. Tumorsuppressorgener er involvert i kontroll av cellesyklus og induksjon av apoptose. Eksempler på tumorsuppressorgener er *p53* og *p21*. De kan bli inaktivert ved en mutasjon. Begge allelene må være mutert for at proteinet/genet skal miste sin funksjon. [36].

1.6 Cellevekst /proliferasjon

Klassisk har man tenkt kreftutvikling som økt proliferasjon, men det kan også skyldes redusert celledød. Celledeling er en krevende operasjon, den kan ikke settes i gang før cellen selv er klar til det. Det er tre sjekkpunkter hvor dette blir kontrollert og det er egne proteiner som ”vokter” sjekkpunktene. Disse proteinene er komplekser av cyclin og cdk (cyclinavhengig kinase, d = dependent). Cyclinene er nødvendige for å aktivere cdken, og denne kan igjen aktivere transkripsjonsfaktorer ved å fosforylere dem. Transkripsjonsfaktorene vil igjen aktivere de genene som trengs for å sette i gang celledelingen. Noen proteiner virker aktiverende og andre hemmende på cellesyklus. Rb og p53 er to proteiner som har bremsende effekt på cellesyklus. Ved DNA-skade vil mengden av aktiv p53 øke betydelig. Uten et funksjonelt *p53* vil en celle med DNA-skade kunne dele seg ukontrollert videre. En slik celle vil da lett kunne gi opphav til kreft [37]. p53 proteinet er et genregulerende protein hvis normal funksjon er å hindre at celler med DNA-skade gjennomfører celledeling; en sikkerhetskontroll, som hindrer proliferasjon. Normalt finnes *p53* i små mengder i cellene, men ved en skade vil mengden øke og proteinet vil indusere transkripsjon av flere gener, deriblant *p21* genet hvis proteinprodukt er avgjørende for å blokkere cellesyklus i overgangen G1 til S. Ved mutasjoner i *p53* vil dette kontrollsyste­met stoppe opp og man kan få akkumulering av DNA-skade, genamplifikasjon og aneuploidi. Mutasjoner er påvist i alle deler av genet og mange av mutasjonene gir p53 proteinet økt halveringstid, slik at det kan påvises immunhistokjemisk [38,39].

1.7 Apoptose

Celleantallet i en multicellulær organisme er bestemt av balansen mellom celledeling og celledød. Celledød forekommer ikke bare relativt passivt, som følge av kjemiske eller mekaniske skader (cellulær nekrose), men også som resultat av en aktiv prosess: apoptose (programert celledød) [40]. Apoptose er en nøye regulert prosess, og dersom reguleringen svikter vil dette kunne resultere i skader under utviklingen av organismen, autoimmune sykdommer, degenerering av nerve­celler eller kreft [41]. Dersom en celle skades av en toksisk forbindelse vil dosen kunne avgjøre om cellen undergår apoptose eller nekrose [42]. Studier har vist at når

kreftceller utsettes for terapeutiske doser med en rekke kjemoterapeutisk eller andre cytotoksiske agenser, både in vitro og in vivo, dør de ved apoptose. Kreftceller kan under noen omstendigheter også dø ved nekrose, f.eks. ved akutt uttalt iskemi. Induksjon av apoptose representerer et prinsipp i behandling av kreft. Det faktum at det eksisterer et "selvmordmaskineri" i kreftcellen gir mange nye muligheter for å utløse celledød i svulster ved spesifikk aktivering av de proteiner som inngår i dette maskineriet [43].

1.8 Inflammasjon

Inflammasjon er en fysiologisk prosess som er kroppens forsvarsmekanisme mot fremmede agens som patogene infeksjoner og kjemisk irritasjon. Den inflammatoriske prosessen involverer forskjellige celletyper både fra medfødt og ervervet immunsystem for å nedkjempe inntrengende faktorer eller for å helbrede skadet vev og homeostase [44]. En indikator på inflammatorisk responser er at cellene skiller ut forskjellige signalmolekyler, cytokiner og andre mediatorer, som er viktige for opprettholdelse og kontinuitet under en inflammasjonsreaksjon. Cytokiner produseres i kroppen under immun- og inflammasjonsprosesser hvor de kan føre til systemisk og/eller lokal effekt [45]. Inflammatoriske celler kan også stimuleres til direkte å produsere oksidanter eller øke syntesen av oksidantgenererende enzymer [46]. Under tumorutviklingen vil det bli en infiltrasjon av leukocytter og da spesielt makrofager. Dette vil være med på å skape et mikromiljø som vil kunne drepe cellene, men som også kan promotere tumorens celleproliferasjon, gi nydanning av kar og metastase [47]. Epidemiologiske studier har vist økt risiko for lungekreft assosiert med kroniske inflammatoriske lungesykdommer som kronisk obstruktiv lungesykdom (KOLS) og astma. Det er en hypotese at radikaler som reaktive oksygenarter (ROS) og reaktive nitrogenarter (RNS), som blir produsert av aktiverte makrofager og neutrofiler, trekkes til inflammasjonsstedet og kan forårsake DNA skader. Bruk av såkalte non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) hos røykere er assosiert med redusert lungekreftisiko. Det kan se ut som om cyclooxygenase-2 (COX-2), som er viktig for produksjon av prostaglandiner, kan spille en viktig rolle. To ulike cyclooxygenase (COX) enzymer katalyserer første trinn i prostaglandinsyntesen. COX-1 finnes i de fleste celletyper mens COX-2 syntetiseres av monocytter og makrofager. Det viser seg at COX-2

er overuttrykt i lungekreft og NSAID hemmer aktiviteten til COX-1 og COX-2 og forstyrrer prostaglandin syntesen [48,49].

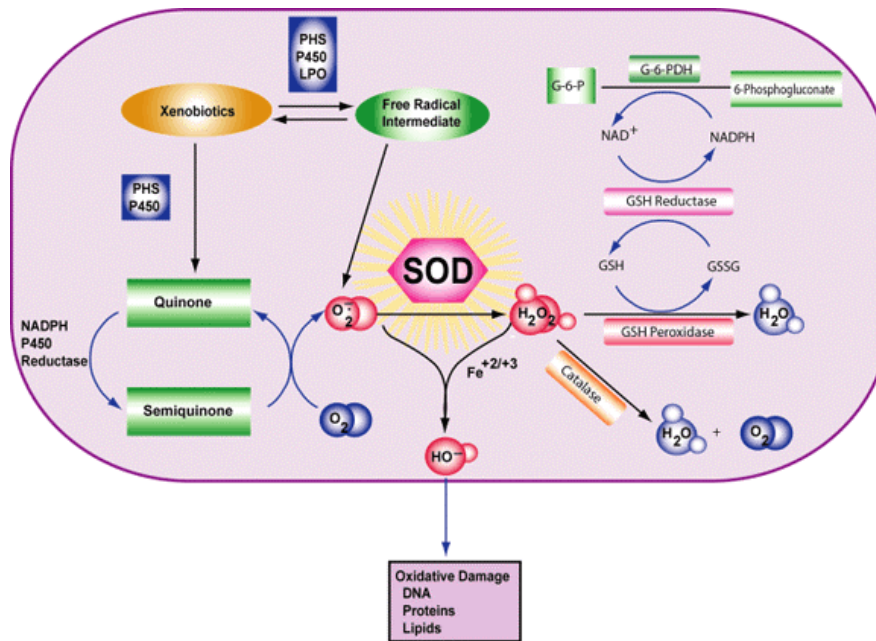
1.9 Oksidativt stress

Betydningen av oksidativt stress er stadig oftere blitt anerkjent som en sentral mekanisme som bidrar til giftigheten av forskjellige fremmedstoffer. Oksidativt stress inngår i patogenesen til mange vanlige sykdommer. Selve begrepet oksidativt stress er uklart definert, men kan forstås som en tilstand med vedvarende overvekt av oksidative produkter, primært på grunn av økt konsentrasjon av frie radikaler. I tillegg kan de være involvert i signaltransduksjon og regulering av genekspressjon via redoksfølsomme mekanismer som igjen kan sette i gang en celleskadende prosess med patogene trekk. Til slutt kan den også indusere apoptose [22, 50].

1.9.1 Reaktive oksygen og nitrogen forbindelser

Organismens cellulære aktiviteter krever oksidasjon og reduksjon for å oppnå optimal funksjon. Dannelsen av ROS og RNS er en del av organismens normale oksidative metabolisme. Eksempler på ROS/RNS er; superoksidanion ($O_2^{\bullet -}$), singlet oksygen (1O_2), hydroksylradikal (OH^{\bullet}), hydrogen peroksid (H_2O_2), hypokloritt ($HOCl$), nitrogenoksid (NO), peroksynitritt ($ONOO^-$) og nitrogendioksid-radikal (NO_2). Toksisiteten til ROS er direkte relatert til dets reaktivitet. Hydrogenperoksid (H_2O_2), nitrogenoksid (NO) og singlet oksygen (O_2) har lav reaktivitet, mens hypoklorid ($HOCl$), nitrogendioksid-radikalen (NO_2) og peroksynitritt ($ONOO^-$) er mer reaktive. Men ingen andre ROS eller RNS er så reaktive som hydroksylradikalet (OH^{\bullet}). ROS reagerer med og skader makromolekyler som proteiner, lipider, RNA og DNA. Det vil si at når antioksidantforsvaret kommer til kort eller er tilintetgjort, skjer skaden på intracellulære makromolekyler og omliggende vev. Når ROS angriper proteiner kan det lede til peroksidering, skade på spesifikke aminosyrer og endringer i tertiær strukturen. Lipid peroksidering vil ødelegge cellemembranens struktur og derved også dens funksjon. I DNA kan ROS forårsake endringer av DNA-basene, gi enkelt og dobbelt DNA brudd. Til slutt kan det også ødelegge DNA reparasjonssystemet [50].

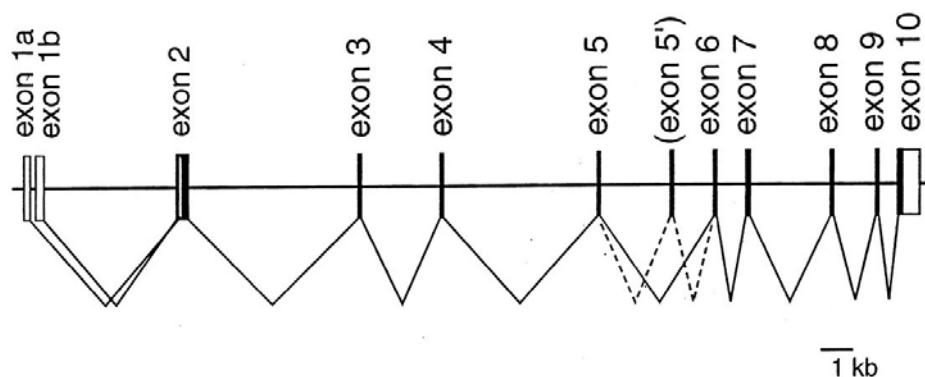
Antioksidanter er cellens forsvar overfor ROS. Antioksidantforsvaret kan deles opp i en enzymatisk og en ikke-enzymatisk del. Av det enzymatiske antioksidantforsvaret er det tre viktige grupper: superoksid-dismutase (SOD), katalase (CAT) og glutathion peroksidase (GPO). Av de ikke-enzymatiske eller lavvekt molekyllære antioksidantene kan en nevne glutathion, vitamin E, vitamin C (askorbinsyre) og urinsyre. Noen antioksidanter blir fremstilt i kroppen mens andre må man få tilført gjennom kosten. De blir kalt diettantioksidanter. Studier *in vitro* tyder på at antioksidanter med ulike kjemiske egenskaper virker sammen i et nettverk [51]. Enzymatisk forsvar mot oksidativt stress er også viktig. SOD katalyserer omsetningen av $O_2^{\cdot-}$ til H_2O_2 . SOD er metallinnholdende enzymer som er avhengige av mangan, kobber eller sink for antioksidantfunksjonen. H_2O_2 blir videre nedbrutt til H_2O på 2 måter ved hjelp av GSH peroksidase (GPO) og katalase (se figur 1.9). CAT finner man i de fleste organer, men leveren er spesielt anrikt. Erytrocytter inneholder store mengder CAT autooksidering. Glutathion (GSH) er til stede i høye konsentrasjoner i alle pattedyrs celler og spiller en avgjørende rolle i cellens antioksidant forsvarsmekanisme. Den mest utbredte gruppen av GPO inneholder sporstoffet selen. Det er en essensiell komponent også i flere andre antioksidantenzzymer og bidrar derfor til cellenes egenproduserte antioksidantforsvar. Glutathion forekommer i redusert form (GSH) og i oksidert form (GSSG), og mange reaktive molekyler kan nøytraliseres ved konjugering med GSH. Både glutathion peroksidase og glutathion reduktase er nødvendige for detoksifisering av ROS med GSH. GPO katalyserer reduksjonen av H_2O_2 med tilstedeværelse av glutathion som blir omdannet til oksidert form (GSSG). Glutathionreduktase med tilstedeværelse av NADPH reduserer GSSG tilbake til GSH. Det vil si at GSSG blir omdannet til GSH igjen av enzymet glutathionreduktase [22, 38, 50].



Figur 1.9 SOD katalyserer omsetningen av O_2^- til H_2O_2 . CAT og GPO fullfører avgiftningen som ble påbegynt av SOD og uskadeliggjør H_2O_2 på hver sin måte ved å degradere H_2O_2 til vann. Kilde: www.bb.iastate [52].

1.10 Mdig genet og Mdig proteinet

I 2002 ble genet myc-induced nuclear antigen-53 (*Mina53*) rapportert av Tsuneoka, M. [53] DNA sekvensen av *Mina53* er 99 % identisk med *Mdig*, og dette tyder på at *Mina53* og *Mdig* er fra samme locus. I denne oppgaven blir *Mina53* genet omtalt som *Mdig*. *Mdig* blir uttrykt ved at det er direkte indusert av *c-Myc*. *Mdig* genet koder for et protein med molekylvekt på 53 kDa og derfor navnet *Mina53*. Det er lokalisert i kjernen og en del av det er konsentrert i nukleolen. Humant *Mdig* består av 12 eksoner. Translasjonen starter i ekson 2 som kommer etter to distinkte eksoner, ekson 1a og ekson 1b. I de to første eksonene er setet for transkripsjon initieringen. Ekson 1b ligger 0,25kb nedstrøms for ekson 1a. Ekson 1b har to E-boks seter (CACGTG). Stopp kodon (TAG) finnes i ekson 10. Figur 1.10. viser den genomiske organiseringen av humant *Mina53* / *Mdig*



Figur 1.10 Genomisk organisering av humant *mina53/Mdig*. Boksene viser exoner [53].

Kartlagte data fra Universitet i California Santa Cruz Genom Browser viste at *Mdig* genet ligger på kromosom 3 (3q12.1).

Spesifikk hemming av *Mdig* uttrykk med en RNA "interference" metode undertrykte celleproliferasjon. Dette tyder på at *Mdig* medvirker i cellevekst som er induisert av *c-Myc*. *c-Myc* er en utbredt mediator i celleproliferasjon og kan transaktivisere uttrykket av forskjellige gener gjennom E-boks domenet. Uttrykket av *Mdig* mRNA og protein er blitt vist å bli induisert av villtype *c-Myc*, men ikke av mutant *c-Myc*. Det er fordi mutant *c-Myc* mangler transaktiveringsdomene. Det er en stor likhet mellom konserverte aminosyresekvens i *Mdig* proteinet mellom gnagere og mennesker. Dette tyder på at proteinet har en viktig rolle i pattedyr. I henhold til resultatene av Tsuneoka et al. tyder det på at *Mdig* er et direkte målgen for *Myc* og at *Mdig* er involvert i celleproliferasjon [53].

I 2005 ble det rapportert av Y. Zhang et al. [54] at de hadde identifisert et nytt gen, mineral støv induert gen (mineral dust induced gen), *Mdig* genet. Det var blitt anvendt en DDRT-PCR teknikk (differential display reverse transcription PCR) hvor det ble brukt mRNA fra alveolære makrofager (AM). AM var fra normalbefolkningen som ikke var gruvearbeidere (kontrollgruppen) og fra gruvearbeidere. Det viste seg å være økt uttrykk av *Mdig* RNA i AM fra gruvearbeidere og også i de forsøk som ble gjort med cellerlinjer og vev fra lungekreftpasienter. Det ble fremskaffet bevis som tydet på induserbar ekspresjon av *Mdig* mRNA ved mineralstøveksponering og alternativ transkripsjon av *Mdig* genet i noen tumorcellerlinjer. Det ble funnet at i størstedelen av lungekreftvev eller lungekreftcellerlinjer ble *Mdig* overuttrykt, og disse observasjonene tyder

på at genet har en viktig rolle for proliferasjonen i cellene og at det kan være assosiert med kreftutvikling [54]. Teye et al. [55] ønsket å kartlegge om *Mdig* er uttrykt i humanetumorer og for å bedømme dens rolle i karsinogenesen ble det undersøkt om *Mdig* er uttrykt i human kolonkreft, noe som ble bekreftet. I IHC farging er anti-*Mdig* antibody farget mer effektivt enn *Ki-67* som er mye brukt celle proliferasjonsmarkør. *c-Myc* er uttrykt i alle faser i celledyklus i celler som prolifererer, men *Ki-67* er uttrykt sent i fasene G₁, S, M, og G₂. Resultatene til Tey et al. [55]. viser at *Mdig* forekommer tidlig i kreftutviklingen og har karakteristiske trekk i kolonkreft og vil derfor mest sannsynlig ha en viktig rolle i kreftutviklingen.

Myc familien (protoonkogener) inneholder 3 viktige gen: *c-Myc*, *n-Myc* og *l-Myc*. Det har lenge vært kjent at nedregulert uttrykk av *Myc* familie genene er assosiert med neoplastiske sykdommer hos mange virveldyr, blant dem mennesker. *Myc* familie genene er også blitt relatert til mange biologiske fenomener (i tillegg til karsinogenese) for eksempel at de kontrollerer apoptose, celle differensiering og celle proliferasjon. Proteiner som er kodet av *Myc* gener tilhører heliks – loop – heliks leucin ranskripsjons faktorer og gir inntrykk av å kontrollere forskjellige gener som medierer hvert enkelt av *Myc* funksjonene [56]. *c-Myc* er det genet som er mest studert av alle protoonkogener og er best karakterisert av *Myc* familien. Generelt er *c-Myc* uttrykk assosiert med celleproliferasjon og er nedregulert i passive og differensierte celler [53].

1.11 Målsetning med oppgaven

Et overordnet formål med denne oppgaven var å studere, *Mdig* som nylig er vist av Y. Zhang et al [54] å induseres av mineralstøv hos gruvearbeidere. Genet er også ofte vist å være uttrykt i lungesvulster og lungekreftceller, men sjeldent i normalt lunge. I denne oppgaven var målet å studere om genvarianter av *Mdig* kan påvirke risikoen for å utvikle lungekreft. Det ble satt opp som mål å karakterisere proteinnivået av *Mdig* for å undersøke om det kan ha en viktig rolle som kreftgen og proliferasjonsmarkør i lungekreft. Det kan også tenkes at polymorfier i *Mdig* genet kunne påvirke genekspresjon og proteinuttrykk.

For å nå disse målene ble det gjort en immunhistokjemisk påvisning av Mdig proteinet i svulster fra 240 lungekreftpasienter. Videre ble det undersøkt om to SNPer i *Mdig* genet kunne ha betydning for proteinets uttrykk. I en befolkningsundersøkelse ble det estimert om forekomsten av SNPene var forskjellig hos lungekreftpasienter og friske kontroller. Denne sammenhengen ble analysert ved og genotype 437 lungekreftpasienter og 437 friske kontroller.

2. Metoder

Det har vært hovedfokus på to ulike metoder i denne oppgaven. Genotyping med TaqMan og PCR har blitt benyttet til genotyping av to SNPer i *Mdig* genet. Mdig proteinet ble påvist ved bruk av immunhistokjemi (IHC) på parafinsnitt i vev fra lungekreft pasienter.

2.1 Prøvematerialet og teknikk for IHC

Det er blitt utviklet en rekke teknikker hvor immunfargesignalet er basert på merking med et enzym istedenfor et fluorokrom. I denne oppgaven blir det anvendt UltraVision ONE Large Volume Detection System HRP Polymer (horseradish (pepperrot) peroxidase). UltraVision ONE er et ultrasensitivt universal-system for deteksjon av primærantistoff både fra mus og kanin. Systemet er biotinfritt hvilket betyr at man unngår problemer med uspesifikk farging grunnet endogent biotin i vevet. UltraVision ONE HRP består av et mindre enzym-antistoff kompleks dannet ved å kombinere små aminosyre-polymerer med HRP og sekundærantistoff. Sekundærantistoffet er redusert til Fab' fragmenter for å redusere uspesifikk bakgrunnsfarging. På grunn av polymerenes minimale størrelse kommer denne lettere i kontakt med målproteinene og trenger lettere ned i vevet, noe som gir høyere sensitivitet og bedre signal.

Det er gjort en immunhistokjemisk påvisning med Mdig antistoffet (Mouse anti-Mina53) på 240 parafinsnitt fra tumorvev hos lungekreftpasienter (se beskrivelse av materialet under resultatdelen) og deretter har snittene blitt mikroskopert og vurdert. Først ble det anvendt ni parafinblokker med tumorvev for å optimalisere betingelsene med bruk av mikrobølgeovn og buffere ved forbehandlingen. Det ble gått videre med tre blokker for å bestemme den optimale fortynningen. Etter at den optimale forbehandlingen og den beste fortynningen på primærantistoffet var bestemt, ble IHC fargingen utført i henhold til etterfølgende prosedyre.

I denne oppgaven er IHC blitt utført manuelt. Vevet ble fiksert i bufret formalin med pH 7,0. Vevet er ført frem over natt i fremføringsmaskin, støpt i parafinblokker og snittet 3-5µm tynne parafinsnitt som er lagt på objektglass dekket med polysine. Deretter er snittene tørket i 30 min. ved

56 °C og videre ved 37 °C over natten. Dette blir gjort for at snittene skal feste seg bedre på objektglassene og hindre at de faller av under den tøffe behandlingen i antigen-retrieval prosessen i mikrobølgeovnen. Snittene blir avparaffinisert i xylen og dehydrert før man starter den immunhistokjemiske fargingen. Alle prøvene ble også farget med en rutinefarge Hematoksilin erythrosin safran (HES) og mikroskopert og klassifisert av patolog.

Ved forbehandling av vevet ble det brukt mikrobølgeovn, og to forskjellige buffere ble testet; DAKO® Target Retrieval sol. pH 9,0 og Tris- EDTA pH 9.0. Vevet ble behandlet i mikrobølgeovn i 7 min. på 1000 watt og siden 15 min på 350 watt. Deretter ble det avkjølt i 20 min.

Når ovenstående er gjort og det er blitt bestemt hvilke parametere som er de optimale, blir forskjellige fortynninger av Mdig antistoffet testet. På følgebrevet til antistoffet er det anbefalt at det blir testet hvilken fortynning som passer best for det vevet som blir brukt. Det er oppgitt 10µg/mL som utgangspunkt. Dette monoklonale antistoffet er levert med konsentrasjonen 0,5 mg/mL i PBS, pH 7,4 og inneholder 0,1% natriumazid. Den passende fortynningen vil bli påvirket av flere faktorer, som blant annet omfatter sekundært antistoff, antigenkonsentrasjon, temperatur og lengden på reaksjonstiden. Alle resultatene blir vurdert i vanlig lysmikroskop og scoret etter vårt laboratoriums protokoll.

Fremgangsrutinene som ble anvendt for IHC fargingen er hentet fra produsentens følgebrev (LAB VISION CORPORATION/NEOMARKERS, UltraVision ONE LargeVolume Detection System HRP Polymer TL-125-HLJ) og tilpasset vårt behov.

Immunhistokjemisk farging med Mouse anti-Mina53, Clone: M532:

ZYMED® Laboratories Invitrogen immunodetection.

Forbehandling av parafinsnitt.

1. Tynne snitt direkte fra parafinblokk 3-5µm legges på polysine behandlede objektglass. Snittene tørkes over natt ved romtemperatur og oppbevares siden i kjøleskap til de blir brukt.
2. Sirkle inn snittene med diamantpenn.

3. Parafinsnitt avvokses 2 x 5 min. xylen (2 bad), 2 x 5 min. absolutt alkohol (2 bad), 2 x 5 min. 96 % alkohol (2 bad), 5 min. 70 % alkohol (1 bad).
4. Vask i destillert vann i 2 x 5 min. (2 bad).
5. Snittene forbehandles i mikrobølgeovn med Tris EDTA pH 9,0 først 7 min. ved 1000 Watt og siden 15 min. ved 350 Watt. Snittene avkjøles ca. 20 min. ved romtemperatur.
6. Skyll godt en gang med Tris med/Tween 20 buffer og vask siden 2 x 5 min. med Tris med/Tween 20 buffer.

Immunhistokjemisk prosedyre.

7. Blokkér endogen peroxidase med tre dråper Large Volume Hydrogen Peroxide Block i 15 min.
8. Skyll 3 x 5 min. med Tris med/Tween 20 buffer.
9. Inkuber snittene i fem min. med Ultra V Block ved rom temperatur (bør ikke overskride 10 min.) NB! Ikke vask.
10. Inkuber snittene med 150 µl fortynnet primærantistoff (Mouse anti-Mdig) i fuktighetskammer ved romtemperatur i 60 min. Primærantistoff fortynnes i Dako Antibody Diluent. Ved farging av parafinsnittet fortynnes antistoffet til 1:1000.
11. Vask negativ kontroll i eget bad for å unngå primærantistoff i skyllevann. Skyll 3 x 5 min. med Tris med/Tween 20 buffer.
12. Inkuber i 30 min. ved rom temperatur med UltraVision ONE HRP Polymer. NB! HRP Polymer er lysømfintlig.
13. Skyll 3 x 5 min. med Tris med/Tween 20 buffer.
14. Inkuber med 200 µl 3,3'Diaminobenzidine (DAB) Plus Chromogen +DAB Plus substrate løsning i 10 min.
15. Skyll 3 x 5 min. med destillert vann.
16. Kjernefarge med Mayers Hematoksilin i 2 min.
17. Blåne i rennende lunkent vann i 5 min.

18. Dehydrer i 1 min. i 70 % alkohol (1 bad), 1 min., i 96 % (1 bad), 1 min. i absolutt alkohol (1 bad), xylen (2 bad).
19. Monter snittene med Cytoseal™ 60 og sett på dekkglass.

Resultat.

Positiv farging: Kjernefarge brun, cytoplasma farges blå.

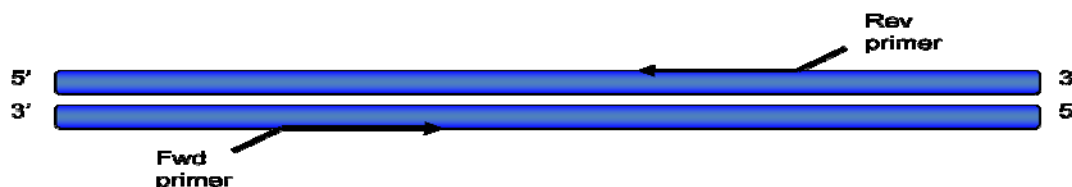
Negativ farging: Kjerner og cytoplasma farges blå.

2.2 Analyse av *Mdig* genet.

Utgangspunktet for analysene av *Mdig* genet og Mdig proteinet er DNA-prøver og vevsprøver fra Biobanken på Statens arbeidsmiljøinstitutt (STAMI) (se resultatdelen). Prøver som ble brukt stammer fra lungekreftpasienter og DNA var isolert fra omkringliggende lungevev, og blodprøver.

2.2.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Det ble designet forward og reverse primere for å amplifisere DNA sekvens bestående av 24 basepar som inneholdt *Mdig* SNP.



FWD: 5'–3' AGT GCA AAA TGG TTA AGT CCA CAG

REV: 5'–3' CAA CTT AGA ATG CCC ATT AAT TGC

Figur 2.1 Forward og reverse primere.

PCR reaksjonen ble satt opp med sluttvolum på 20 µl, se tabell 2.1 PCR programmet er vist i tabell 2.2.

Tabell 2.1 Reagenser for PCR.

Reagenser	I hver brønnr	Bruksløsning
Reverse primer	0,5 µl	10 pmol/µl
Forward primer	0,5 µl	10 pmol/µl
10x buffer for DyNAzyme II	2 µl	10x
DyNAzyme II DNA Polymerase	0,5 µl	2 U/µl
dNTP	2 µl	2 mM
dH ₂ O	14 µl	
Sum volum	19,5 µl	
DNA prøve	0,5 µl	100 ng/µl
Slutt volum	20 µl	

Tabell 2.2 PCR program.

Temperatur	Tid	
94°C	5 min	
94°C	40 sek	} X 30
56°C	40 sek	
72°C	40 sek	
72°C	10 min	
4°C	∞	

2.2.2 Agarose gel elektroforese

Agarose gel elektroforese er en basisteknikk innen genteknologi. Teknikken er enkel og hurtig. Den separerer og identifiserer DNA i forhold til størrelse. For å synliggjøre DNA-båndene i en gel kan man tilsette etidiumbromid (EtBr) som vil binde seg inne i DNA-molekylet.

EtBr er fluorescerende og vil ved UV-belysning markere DNA i agarose gelen.

1. For å lage en stor 2 % agarose gel ble 120 ml av 1 x TAE eller 0,5 x TBE buffer blandet med 1,2 gr. SeaKem GTG Agarose + 1,2 gr. NuSieve 3:1 Agarose. Blandingen ble kokt i mikrobølgeovn til den løste seg opp.
2. Agarose gelen ble avkjølt ned til ca. 50 °C før det blir tilsatt 12 µl EtBr (1 mg/ml). Det hele ble blandet godt og helt over i form før den stivner. Passende kam ble brukt for å lage brønner.
3. 5 µl av PCR prøvene blir blandet med 2 µl av loading buffer og tilsatt i brønnene på gelen. Passende molekylvektstandard (ladder) blir valgt og 2,5 µl tilsatt i en brønn. Standarden benyttes til å anslå størrelsen av DNA fragmenter og kan i tillegg benyttes til å anslå mengde DNA i hvert bånd.
4. Kjørt på ca 100 V i 40 – 60 min.

2.2.3 Kutting med restriksjonsenzym

Restriksjonsenzymene kan brukes henholdsvis til genotyping og kloning. For å kutte PCR produktet ble det brukt restriksjonsenzymet: Alu I. Kuttereaksjonen ble satt opp på følgende måte med sluttvolum på 10 µl, se tabell 2.3.

Tabell 2.3 *Reagenser for kutting av PCR.*

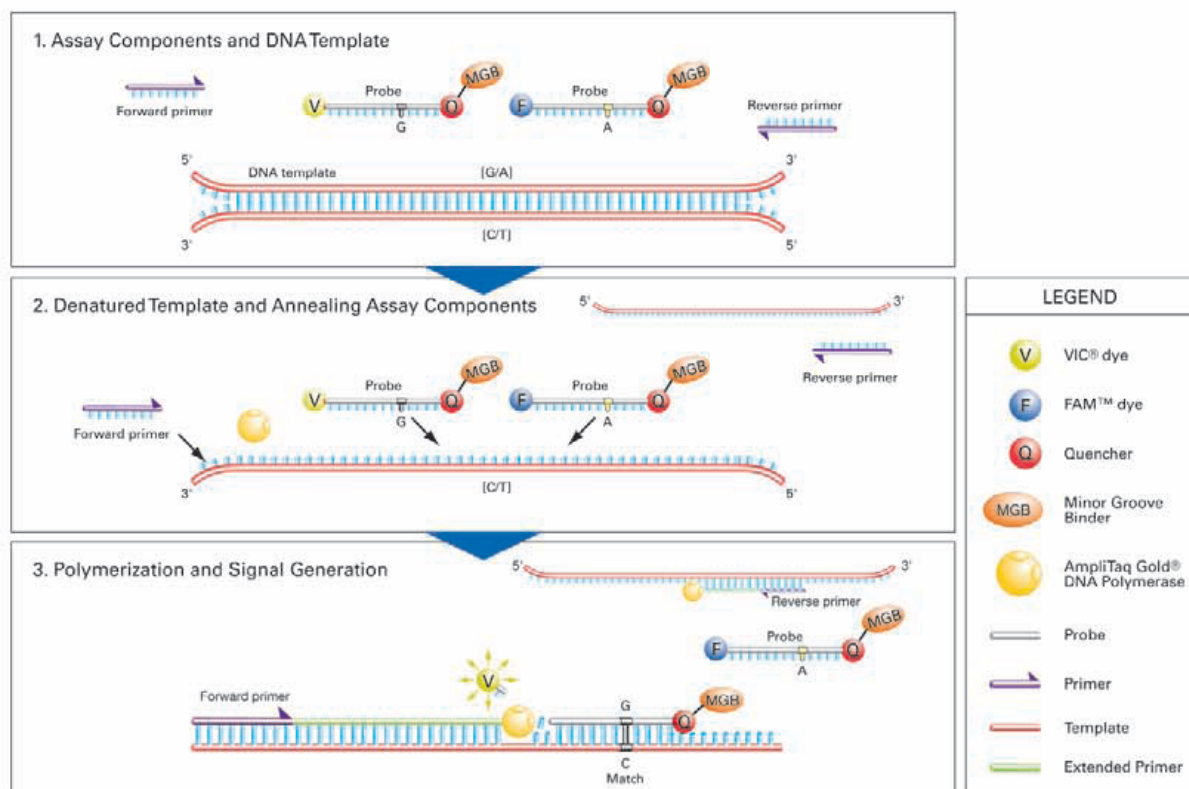
Reagenser	µl x1 prøve
ddH ₂ O	0,5 µl
10 x NEBuffer	1 µl
Enzym Alu I	0,5 µl
PCR produkt	8 µl
Totall volum	10 µl

Reagensene ble spunnet ned, og inkubert i 2 timer ved 37 °C. Fragmentene ble kjørt på en 2 % agarosegel.

2.3 Genotyping

Genotyping av *Mdig* SNP rs2172257 C/T og *Mdig* SNP rs699304 C/T ble utført med TaqMan.

TaqDNA polymerase 5′ nuklesase aktivitet er brukt i Taqman analyser for å genotype SNPer. Taqman analysen er utført samtidig med en PCR reaksjon og resultatene blir avlest i sanntid og innebærer at man følger reaksjonen og ser resultatene mens den skjer. Det behøves forward og reverse primere som amplifiserer området som inkluderer SNPens sekvens og genspesifikke prober som er merket med en av to fluoroforer (F) (i denne oppgaven FAM for T/T og VIC for C/C) nær 5′enden (en reporter), og en quencher (Q) nær 3′enden. En quencher er et molekyl som fanger opp signalet fra reporteren. Quencheren gjør at reporteren F ikke gir noe signal så lenge de sitter sammen på proben. Reporterproben er laget slik at den binder seg til et område av målesekvensen, altså PCR produktet. Når neste runde av PCR starter, vil både PCR primeren og reporterproben feste seg. DNA polymerasen vil lage nytt cDNA ut i fra primeren, og når det kommer til det området der reporterproben sitter, vil denne bli kuttet fordi enzymet har 5′→3′eksonukleaseaktivitet. Da vil quenchingen opphøre og reporteren vil gi signal (emisjon). I løpet av PCR vil fluoroforsignalet øke for hver syklus, proporsjonalt til andelen probe som blir kuttet. Dette signalet vil være spesifikt for PCR produktet med gitt SNP genotype [57]). Ettersom de to probene er spesifikke for en av genotypene i SNPen, vil en eller begge fluorforene bli dominerende og gi enten homozygoter eller heterozygoter.



Figur 2.2. Oversikt over TaqMan metoden. Kilde. Applied Biosystems [58].

Figur 2.2 viser oversikt over TaqMan PCR metoden fra Applied Biosystems. Applied Biosystems har utviklet en metode hvor det blir brukt Minor groove binder (MGB) på 3'enden på proben. Den binder seg til dsDNA i minor groove. MGB øker smeltetemperaturen (T_m) uten å øke lengden på proben. Den gjør det også mulig å bruke kortere prober samtidig som det bidrar til en mer nøyaktig metode [59].

TaqMan genotyping ble utført etter følgende prosedyre:

Det ble brukt TaqMan®Universal PCR Master Mix som inneholder: AmpliTaq Gold® DNA-polymerase, AmpErase® UNG, dNTPs med dUTP, passiv referanse og optimalisert buffer som er beregnet til varierte typer cDNA. Det ble brukt brett med 384 brønner med 4,5 µl mastermiks i hver. Se tabell 2.4. Alle reagenser unntatt DNA prøven ble tilsatt i mastermiksen.

Tabell 2.4 Mastermiks til 384 brønnebrett

Reagenser	Totalvolum 5 µl per brønn
ddH ₂ O (filtrert vann)	1,75 µl
TaqMan®Universal PCR Master Mix	2,5 µl
20 x Assay on Demand™ (AoD)	0,25 µl
Volum per brønn	4,5 µl
DNA prøve 20 ng/µl	0,5 µl
Totalvolum	5 µl

Deretter ble det tilsatt 0,5 µl DNA prøve i hver brønn. Halvparten av brettet ble tilsatt prøver fra lungekreft pasienter mens den andre halvparten ble tilsatt prøver fra friske kontroller. Platene ble sentrifugert og satt i en PCR maskin hvor det ble utført TaqMan PCR program se tabell 2.5.

Tabell 2.5 *TaqMan PCR program.*

Temperatur	Tid	
50 °C	2 min	
95 °C	10 min	
95 °C	15 sek	} X 40
60 °C	1 min	
°C	∞	

Deretter ble brettet satt inn i ABI PRISM® 7900 HT maskinen. Detekteringen utføres ved Allelic discrimination programmet. Det ble utført beregninger i en statistikk programpakke, SPSS versjon 15,1. Hardy Weinbergs og Chi-kvadrat (X^2) testen ble brukt for å finne ut om resultatene eventuelt var signifikante.

2.4 Statistiske metoder

I dette kapitlet er det en beskrivelse av de statistiske metodene som er blitt brukt i denne oppgaven.

2.4.1 P-verdier og odds ratio

P-verdier

P-verdien er den beregnede sannsynligheten for å få det observerte resultat av teststørrelsen eller et resultat som er enda mer i motstrid med nullhypotesen, under forutsetning av at nullhypotesen holder. Statistisk signifikans er mål på sannsynligheten for at to ting er forskjellige. Sannsynligheten for at for eksempel A er forskjellig fra B kan beregnes matematisk. Når det er minst 95 % sjanse for at det foreligger en forskjell, sier man gjerne at forskjellen er statistisk signifikant og skyldes altså

neppe tilfeldigheter. Når p er mindre enn 0,05 betyr det at det er mindre enn 5 % sjanse for at A og B er like, og dermed er altså mer enn 95 % sjanse for at A er forskjellig ifra B. P er lik med 0,01 betyr på samme måte at den sjansen for likhet er 1 % og sjansen for ulikhet er 99 % [60].

Odds ratio

Oddsforholdet er hyppig brukt mål for assosiasjoner. Odds er forholdet mellom to sannsynligheter: sannsynligheten for et utfall dividert med sannsynligheten for at dette ikke skal hende. Odds ratio er forholdet mellom to odds. Dette er et effektmål som vanligvis blir brukt i kasus - kontrollstudier. Odds ratio er lik med 1 tyder på at det ikke er noen sammenheng mellom sykdom og eksponering. Odds ratio > 1 tyder på at risikoen er større hos en eksponert gruppe individer enn hos ikke eksponerte. Odds ratio < 1 antyder en beskyttende effekt av eksponeringen. Odds ratio må være $\neq 0$ [60].

2.4.2 Regresjonsanalyse

I regresjonsanalyse studerer man samvariasjon mellom to variabler som man i utgangspunktet antar er kontinuerlige: Det som er interessant er sammenhengen mellom en avhengig variabel og en forklaringsvariabel (uavhengig variabel). Sammenhengen antas å være lineær. Matematisk kan sammenhengen uttrykkes som en lineær funksjon som vist i ligning 1.

$$\text{Ligning 1: } y = \alpha + \beta x.$$

Her betyr α skjæringspunktet mellom y –aksen og linjen, dvs. høyden der linjen skjærer y –aksen, mens β betegner hvor mye y – verdien stiger når x stiger med én enhet.

For å finne den linjen som passer best til observasjonene dvs. regresjonslinjen blir det brukt minste kvadraters metode.

Det er en nær sammenheng mellom Pearsons korrelasjonskoeffisient og regresjonskoeffisienten. En korrelasjonskoeffisient (r) er et symmetrisk mål for sammenhengen mellom to kontinuerlige variabler. Korrelasjonskoeffisienten varierer mellom -1 og 1 slik at for verdier nær -1 eller 1 er det sterk negativ eller positiv sammenheng mellom variablene. Hvis den estimerte korrelasjonskoeffisienten er nær null, er det ingen (lineær) sammenheng mellom variablene. Hvis vi har flere enn to avhengige variabler, kan vi finne korrelasjonskoeffisienter mellom alle par av variablene. I situasjoner med normalfordelte eller nær normalfordelte variabler vil vi bruke Pearsons korrelasjonskoeffisient. Korrelasjonskoeffisienten måler en symmetrisk sammenheng, uten at vi tar standpunkt til retningen på sammenhengen, den måler "forklart varians" [60].

2.4.3 Chi – kvadrat test og Fisher eksakt test

Chi-kvadrat test brukes til å bestemme om det er signifikant forskjell mellom observert og forventet frekvens av to datasett [60]. Bare frekvensdata kan analyseres med en chi -kvadrat test dvs. testen baserer seg på diskrete variable. Når det er ønske om å studere forskjellen mellom et sett observerte frekvenser brukes det chi-kvadrat statistikk.

En **Fisher eksakt test** brukes i stedet for chi-kvadrat test hvis en har en 2 x 2 kontingens tabell med små tall, med mindre enn 5 forventede observasjoner i hver enkelt celle. Egentlig ser man på betingede sannsynligheter (som gir betinget p-verdi) gitt marginal summene. Dette gir en test som garantert holder signifikansnivået, men kan være konservativ (dvs. har lavere teststyrke enn nødvendig) [61].

2.4.4 Logistisk regresjonsanalyse for SNP assosiasjoner

Kasus kontroll studier er karakterisert ved at forsøkspersonene er valgt ut med utgangspunkt i effektvariabelen. I studier av sykdom er effektvariabelen karakterisert ved syk/ikke syk, som da gir henholdsvis pasienter og kontroller, med pasienter som kasus. Kontrollene trekkes blant dem som hadde blitt pasienter (kasus) dersom de hadde blitt syke. Pasient - kontroll studier gjennomføres ofte ved "matching" på variabler som alder, kjønn, røyking, og så videre. Resultatet vil være en assosiasjon mellom eksponering (for eksempel SNP-kategori) og sykdomskategori og angis som et odds ratio-estimat. Konfidensintervallet til odds ratio-

estimatet gir et mål på hvor robust resultatet er, eller hvor stor rolle tilfeldig variasjon kan ha. Det er mulig å studere SNPer for å se på genotype fordelingen i henholdsvis pasienter og friske kontroller og på den måten identifisere risiko-alleler for sykdom.

Logistisk regresjon er ofte brukt når en ønsker å teste assosiasjonen mellom forskjellige genotyper og sykdommer. Dette er en metode hvor sannsynligheten for frekvens blir funnet ved å plote data til logistisk kurve. Variablene er enten kategoriske eller numeriske. Ved å bruke logistisk regresjon er det mulig og justere for bakgrunnsfaktorer som kjønn, alder og røyking for å oppnå mer korrekte (valide) resultater. Genotype fordelingen i kontrollene bør være i Hardy-Weinberg likevekt. Denne likevekt er basert på at forskjellige genotyper i tilfeldig valgt befolkning vil ha bestemt fordeling [60].

3. Resultater

Resultatdelen er delt opp i to kapitler. Kapittel 3.1 omhandler påvisning av Mdig proteinet med en IHC farging. Det er valgt ut bilder for å illustrere fargingene og resultatene er beskrevet i tabeller. I kapittel 3.2. er det tatt for seg TaqMan genotyping resultater for *Mdig* SNP rs2172257 C/T (SNP 1) og *Midg* rs699304 C/T (SNP 2).

3.1 Immunhistokjemisk farging av tumorvev

Det ble gjort en IHC farging for Mdig av 240 prøver fra lungekreftpasienter som deretter ble mikroskopert. Det ble brukt vevssprøver fra lungekreft genetikk biobanken ved Statens arbeidsmiljøinstitutt (STAMI). Lungekreftpasientene er blitt diagnostisert med ikke-småcellet lungekreft og tatt inn til kirurgi ved universitetssykehusene i Oslo og Bergen i årene mellom 1986 og 2002.

3.1.1 Immunhistokjemisk farging av Mdig proteinet

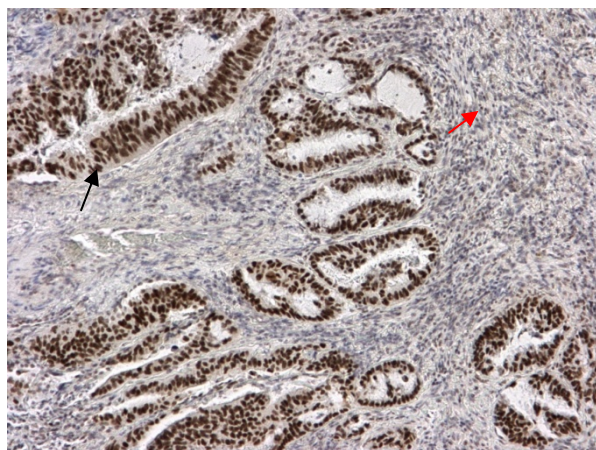
For å sikre at antistoffet for Mdig fungerte optimalt ble det benyttet et kjent positivt lungekreftpreparat og en substitusjonskontroll, som ble behandlet henholdsvis med og uten antistoff. Den positive kontrollen viste lik fargeintensitet i alle forsøkene. Som forventet var proteinet hovedsakelig lokalisert i cellekjernen. Men som enkelte prøver viste var det også lokalisert i cytoplasma. Alle resultatene ble vurdert i lysmikroskop og fikk en poenggivning etter vårt laboratoriums protokoll. Videre ble de sammenlignet av to uavhengige personer, hvorav en er spesialist i patologi. Hvert snitt fikk et poeng i forhold til fargeintensiteten eller areal som vist i tabell 3.1.

Tabell 3.1. Kriterier for IHC farging.

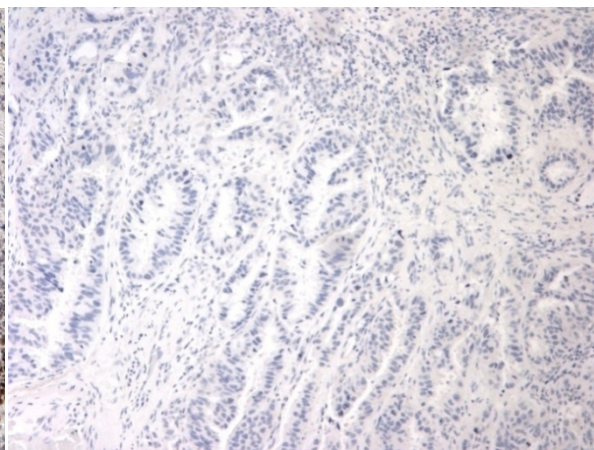
Fargeintensitet 1 - 4	Areal 0 - 3
1 – lav	0 - ≤20 %
2 – middels	1 - 21 % -60 %
3 – høy	2 - 61 % -80 %
4 – meget høy	3 - 81 % -100 %

Med areal menes det hvor mange tumorceller som er positivt farget i forhold til det totale antall tumorceller. Alle snitt med areal under 20 % ble sett på som negative.

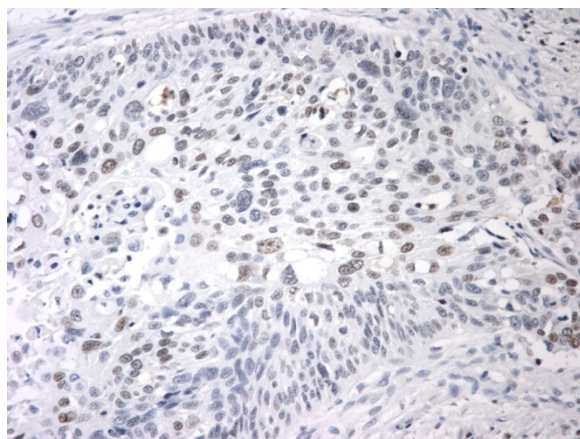
Figur 3.1 og 3.2 viser henholdsvis positiv og negativ kontroll. På figur 3.1 er cellekjernene med brun farge positive for Mdig. De store mørkebrune kjernene er tumorceller (sort pil) og de mindre brune (rød pil) er infiltrerende lymfocytter. Figur 3.2 viser den negative kontrollen hvor Mdig ikke er tilstedeværende. Alle snittene ble farget med bakgrunnsfargen hematoksilin som er blåaktig. Figur 3.3, 3.4, 3.5, og 3.6 hadde positivt fargede tumorceller, men med varierende fargeintensitet. Figur 3.3 illustrerer et snitt med fargeintensitet 1 = lav, figur 3.4 viser fargeintensitet 2 = middels, figur 3.5 viser fargeintensitet 3 = høy, mens figur 3.6 viser fargeintensitet 4 = meget høy.



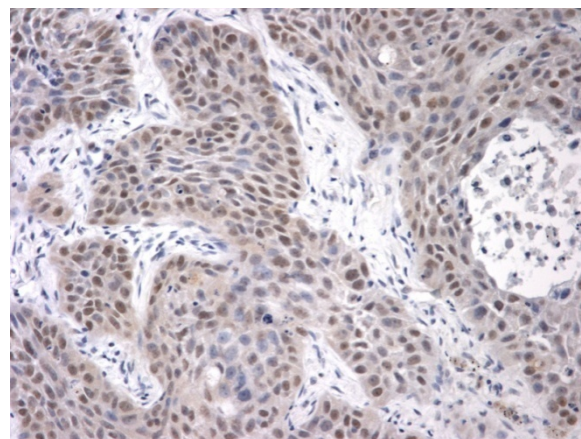
Figur 3.1 DB nr. 732. Positiv kontroll.
Forstørrelse x10.



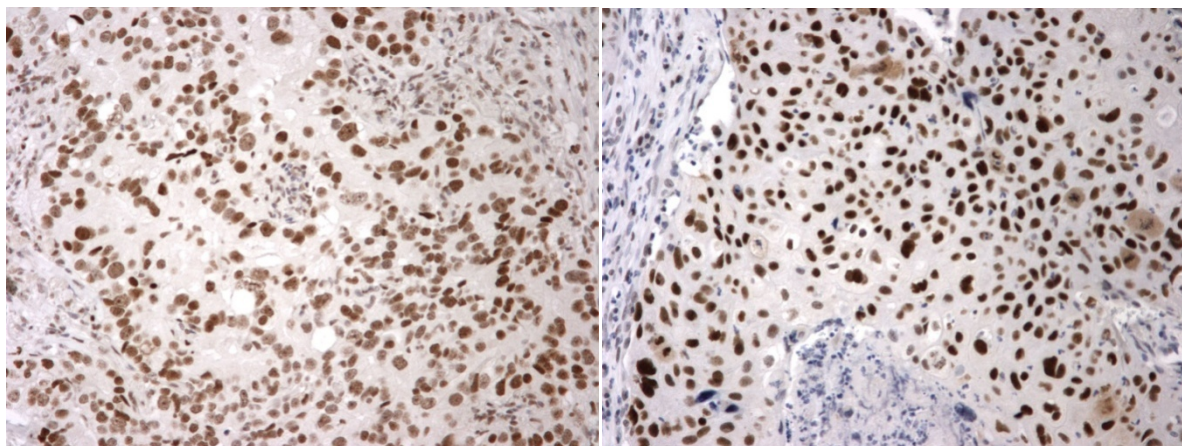
Figur 3.2. DB nr. 732. Negativ kontroll.



Figur 3.3. DB nr. 18. Fargeintensitet 1.
Forstørrelse x 20.



Figur 3.4. DB nr. 228. Fargeintensitet 2.



Figur 3.5. DB nr. 694. Farge intensitet 3. **Figur 3.6.** DB nr. 648. Farge intensitet 4.

I lungekreftmaterialet som ble benyttet for farging av Mdig var det tilgjengelige data på røyking, hos 231 av pasientene og for alder, kjønn og histologi for 240 av pasientene (tabell 3.2). Lungekreftpasienter med storcellet karsinom var signifikant yngre enn lungekreftpasienter med plateepitelkarsinom. Lungekreftpasienter med adenokarsinom og storcellet karsinom hadde signifikant færre røykeår enn plateepitelkarsinom pasienter. Adenokarsinom pasienter hadde røykt signifikant færre pakkeår enn plateepitelkarsinom pasienter. Det ble også testet for ulikheter mellom adenokarsinom og storcellet karsinom i forhold til alder og røykevaner, hvor lungekreftpasienter med storcellekarsinom var 3,7 år yngre enn pasienter med adenokarsinom ($p = 0,038$). Gjennomsnittsalderen på alle lungekreftpasienter var $64,3 \pm 9,9$.

Tabell 3.2. *Karakteristikker av lungekreftpasienter*

Parameter	Alder		Røykedata ¹		
	Antall (%)	Gj.snitt (±SD)	Sigaretter pr. dag Gj.snitt (±SD)	Røykeår Gj.snitt (±SD)	Pakkeår ² Gj.snitt (±SD)
Plateepitel Karsinom	95 (39,6)	65,6±9,9	14,7±6,9	43,1±12,1	32,1±17,7
Adeno Karsinom	97 (40,4)	64,7±9,6	12,8±7,6	35,8±17,5**	25,5±17,4*
Storcellet Karsinom	46 (19,2)	61,0±10,2**	15,3±9,8	36,7±13,3*	29,4±22,2
Karsinom, uspesifisert	2 (0,8)	58,5±5,0,	11,0±4,2	37,5±6,4	21,0±11,3
Total	240 (100)	64,3±9,9	14,03±7,8	38,9±15,0	28,9±18,6

¹Røykedata mangler for 9 personer. ²Pakkeår = antall sig. per dag x antall år / 20.

P = verdier om det er forskjell på gj.snitt fra referansegruppen plateepitelkarsinom). *p < 0,05, ** p < 0,01.

Vi ønsket også å teste om det var en eventuell sammenheng mellom kjønnsfordeling og histologi, med røykedata og alder. I dette materialet var det 27,9 % kvinner og 72,1 % menn. Tabell 3.3 viser en oversikt over alder og røykevaner hos de kvinnelige lungekreftpasientene og tabell 3.4 viser en oversikt over alder og røykevaner hos de mannlige lungekreftpasientene. Kvinner hadde høyere forekomst av adenokarsinomer, mens plateepitelkarsinomer var mer frekvent hos menn (tabell 3.4). De ulike histologiene viste signifikante forskjeller i forhold til kjønn (P=0,004, Kji-kvadrat (2df) = 13,16).

Tabell 3.3. *Karakteristikker for kvinnelige lungekreftpasienter.*

Parameter	Alder		Røykedata		
	Antall (%)	Gj.snitt (±SD)	Sigaretter pr. dag Gj.snitt (±SD)	Røykeår Gj.snitt (±SD)	Pakkeår ¹ Gj.snitt (±SD)
Plateepitel Karsinom	17 (25,4)	65,7±11,1	11,6±5,7	39,1±11,8*	22,0±12,1
Adeno-karsinom	39 (58,2)	65,6±9,0*	8,7±7,6	26,5±19,6	16,4±17,4
Storcellet karsinom	11 (16,4)	57,2±9,9*	14,9±9,2*	37,2±10,0	28,1±19,1*
Total	67 (100)	64,2±10,1	10,5±7,7	31,5±17,5	19,8±16,9

¹Pakkeår = antall sig. per dag x antall år / 20. P = verdier om det er forskjell på gj.snitt fra referansegruppen (adenokarsinom). *p < 0,05, p ** p < 0,01.

Totalt hadde 58,2 % av kvinnene adenokarsinomer. Ettersom det var flest kvinner som hadde adenokarsinomer ble det brukt som referanse. Kvinner med adenokarsinomer var signifikant eldre enn kvinner med storcelletkarsinomer. Det viste seg at plateepitelkarsinom og storcelletkarsinom er sterkere assosiert med røyking enn adenokarsinom. Kvinner med plateepitelkarsinom og storcellet karsinom røykte signifikant mer enn de med adenokarsinom henholdsvis (røykeår, sigaretter per dag og pakkeår). Disse resultatene bekrefter tidligere funn som har vist at adenokarsinom krefttype er mindre knyttet til røykevaner.

Tabell 3.4. *Karakteristikker for mannlige lungekreftpasienter.*

Parameter	Antall (%)	Alder	Røykedata		
		Gj.snitt (±SD)	Sigaretter pr. dag Gj.snitt (±SD)	Røykeår Gj.snitt (±SD)	Pakkeår ¹ Gj.snitt (±SD)
Plateepitel- karsinom	78 (45,1)	65,6±9,7	15,4±7,0	43,9±12,0	34,3±18,0
Adeno- karsinom	58 (33,5)	64,0±10,0	15,6±6,3	42,0±12,6	31,7±14,6
Storcellet karsinom	35 (20,2)	62,0±10,1	15,4±10,1	36,6±14,3**	29,9±23,3
Karsinom, uspesifisert	2 (1,2)	58,5±5,0,	11,0±4,2	37,5±6,4	21,0±11,3
Total	173 (100)	64,3±9,9	15,4±7,5	41,8±12,9	32,4±18,1

¹Pakke år = antall sig. per dag x antall år / 20.

P = verdier om det er forskjell på gj.snitt fra referansegruppen (plateepitelkarsinom). ** p < 0,01, *p < 0,05.

Menn hadde høyest forekomst av plateepitelkarsinom (45,1 %) og denne ble derfor benyttet som referanse i våre analyser. Krefttypene var svakt assosiert til menns røykevaner, hvor menn med storcellet karsinom hadde signifikant færre røykeår (p = 0,006) enn menn med plateepitelkarsinom. For menn var det bare små forskjeller i alder i ulike histologitypene (tabell 3.4).

Tabell 3.5 viser forskjellen mellom kjønn, alder, tobakk, pakkeår og histologi mot positivt og negativt areal og positiv og negativ fargeintensitet.

Tabell 3.5 *Kjønn, alder, røykevaner og histologi mot areal og kjerne fargeintensitet.*

Variabel	Areal (%) ¹		Farge Intensitet ² (%)	
	negativ	positiv	negativ	positiv
Alle	47 (19,6)	193 (80,4)	18 (7,5)	222 (92,5)
Menn	37 (21,4)	136 (78,6)	13 (7,5)	160 (92,5)
Kvinner	10 (14,9)	57 (85,1)	5 (7,5)	62 (92,5)
Alder (alle)				
< 60 år	14 (21,9)	50(78,1)	6 (9,4)	58 (90,6)
≥ 60 år	33 (18,8)	143 (81,2)	12 (6,8)	164 (93,2)
Røykevaner (alle)				
Ikke-røykere	0 (0)	12 (100)	0 (0)	12 (100)
Røykere	46 (21,0)	173 (78,9)	18 (8,2)	201 (91,8)
Histologi (alle)				
Plateepitelkarsinom	19 (20,0)	76 (80,0)	7 (7,4)	88 (92,6)
Adenokarsinom	20 (20,6)	77 (79,4)	9 (9,3)	88 (90,7)
Storcelletkarsinom	7 (15,2)	39 (84,8)	1 (2,2)	45 (97,8)

¹Areal: ≤ 20 % = negativ, positiv = 21 %-100 %.

² Farge intensitet: negativ = Ingen farging, positiv = alle med farging.

**p < 0,01 *p < 0,05.

Tabell 3.5 viser ingen kjønnsforskjeller når man ser på areal og fargeintensitet. Både blant kvinner og menn er det langt flere som farger enn de som ikke farger. Det var ingen forskjell i farging i forhold til alder (over og under 60 år) eller kreftformer. På areal er det tendens til at ikke røykere farger mer enn røykere. Kji-kvadrat statistikken var 3,15 (1

frihetsgrad) dvs. P-verdi 0,076. I Fisher`s exact test var tosidig P verdi 0,131. På fargeintensitet er det ingen forskjell på røykere og ikke røykere. Det er mulig at areal korrelerer bedre med ekspresjon av *Mdig* enn fargeintensitet.

I tillegg til todelt areal og farge intensitet som i tabell 3.5. viser tabell 3.6. og tabell 3.7. fordelingen av kreftsvulstene i henhold til de kriterier som er blitt satt på hvert vevssnitt.

Tabell 3.6 Histologi, kjønn, alder og røykevaner mot fargeintensitet.

Variabel	Fargeintensitet					
	Ingen farge	Lav	Middels	Høy	Meget høy	Total
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Histologi						
Plateepitelkarsinom	7 (7,4)	29 (30,5)	35 (36,8)	15 (15,8)	9 (9,5)	95 (100)
Adenokarsinom	9 (9,3)	33 (34,0)	32 (33,0)	20 (20,6)	3 (3,1)	97 (100)
Storcellet karsinom	1 (2,2)	12 (26,1)	19 (41,3)	10 (21,7)	4 (8,7)	46 (100)
Karsinom uspesifisert	1 (50)	0	1 (50)	0	0	2 (100)
Total	18	74	87	45	16	240
Kjønn						
Menn	13 (7,5)	55 (31,8)	64 (37,0)	26 (15,0)	15 (8,7)	173 (100)
Kvinner	5 (7,5)	19 (28,4)	23 (34,3)	19 (28,3)	1 (1,5)	67 (100)
Total	18	74	87	45	16	240
Alder						
<60	6 (9,4)	22 (34,4)	22(34,4)	12 (18,8)	2 (3,1)	64 (100)
≥61	12 (6,8)	52 (29,5)	65 (36,9)	33 (18,8)	14 (8,0)	176 (100)
Total	18	74	87	45	16	240
Røykevaner						
Aldri røyker	0	4 (33,3)	3 (25,0)	4 (33,3)	1 (8,3)	12 (100)
Røyker eller tidligere røyker	18 (8,2)	68 (31,1)	79 (36,1)	39 (17,8)	15 (6,8)	219 (100)
Total	18	72	82	43	16	231

**p < 0,01 *p < 0,05.

Tabell 3.7 Histologi kjønn, alder og røykevaner mot areal.

Variabel	Areal				
	≤ 20%	21 – 60%	61 – 80%	81 – 100%	Total (%)
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Histologi					
Plateepitelkarsinom	19 (20,0)	31 (32,6)	25 (26,3)	20 (21,1)	95 (100)
Adenokarsinom	20 (20,6)	30 (30,9)	18 (18,6)	29 (29,9)	97 (100)
Storcellet karsinom	7 (15,2)	5 (10,9)	13 (28,3)	21 (45,6)	46 (100)
Karsinom uspesifisert	1(50)	0	1 (50)	0	2 (100)
Total	47	66	57	70	240
Kjønn					
Menn	37 (21,4)	48 (27,7)	42 (24,3)	46 (26,5)	173 (100)
Kvinner	10 (14,9)	18 (26,9)	15 (22,3)	24 (35,8)	67 (100)
Total	47	66	57	70	240
Alder					
<60	14 (21,9)	20 (31,2)	13 (20,3)	17 (26,6)	64(100)
≥61	33 (18,8)	46 (26,1)	44 (25,0)	53 (30,1)	176 (100)
Total	47	66	57	70	240
Røykevaner					
Aldri røyker	0	3 (25)	3 (25)	6 (50)	12 (100)
Røyker eller tidligere røyker	46 (21,0)	59 (26,9)	51 (23,3)	63 (28,8)	219 (100)
Total	46	62	54	69	231

**p < 0,01 *p < 0,05.

Tabell 3.6 og 3.7 viser ingen signifikante forskjeller mellom de ulike kreftformer på fargeintensitet og areal. Tabell 3.6 viser ingen forskjell mellom menn og kvinner for de som er negative. Det samme gjelder for lav og middels fargeintensitet. I høy fargeintensitet er det flere kvinner mens i meget høy fargeintensitet er det langt flere menn. Dette er

grensesignifikant ($P = 0,052$). Areal i forhold til fargeintensitet ga ikke signifikante forskjeller. Det er ingen signifikant forskjell i alder på lungekreftpasienter som er over og under 60 år mot fargeintensitet og areal og heller ikke forskjell på fargeintensitet mellom røykere og ikke-røykere. Det er svært få ikke-røykende pasienter men på areal er det tendens til at ikke-røykere farger større areal enn røykere. Chi-kvadrat statistikken var 3,15 (1 frihetsgrad) dvs. P-verdi 0,076. Fisher's exact test hadde en tosidig P verdi på 0,131.

3.2 Genotyping av polymorfier i *Mdig*.

Prøver fra Biobanken på Statens arbeidsmiljøinstitutt (STAMI) ble genotypet for to polymorfier, *Mdig* SNP rs2172257 C/T og *Mdig* SNP rs699304 C/T. Biobanken består av 437 individer som er født i Norge og av norsk herkomst. De er blitt diagnostisert med NSCLC og tatt inn til kirurgi ved universitetssykehusene i Oslo og Bergen i årene mellom 1986 og 2002. Friske kontroller er hentet fra HUBRO prosjektet (en allmenn helseundersøkelse) som ble foretatt i 2000-2002 av befolkningen i Osloområdet. De friske kontrollene i denne studien er valgt ut etter følgende kriterier: (i) 59 år og eldre; (ii) har røykt mer enn 5 sigaretter per dag; (iii) er røykere eller sluttet for mindre enn 5 år siden. Disse 437 friske kontrollene ble tilfeldig valgt ut og tilpasset lungekreft pasientene etter alder, røykedose og kjønn. Fra kontrollene og lungekreftpasientene er det blitt isolert DNA fra blod og normalt lungevev.

3.2.1 Genotyping av *Mdig* SNP rs2172257 C/T og rs699304 C/T

Det ble genotypet to polymorfier i *Mdig* genet, SNP *Mdig* rs2172257 C/T og *Mdig* rs699304 C/T i 437 lungekreftpasienter og 437 friske kontroller. DNA ble isolert fra blod eller vev og ble brukt som templat for genotyping av polymorfier i *Mdig* genet. Egenskapene til både pasienter og kontroller er presentert i tabell 3.8. Ikke parametrisk Wilcoxon test for uavhengige grupper viste at det ikke var signifikante forskjeller mellom pasienter og friske kontroller mht matching-variablene.

Tabell 3.8. *Karakteristikker for lungekreftpasienter og friske kontroller*

Variabel	Lungekreft pasienter	Friske kontroller
	N = 437	N = 437
Menn	318 (72,8 %)	333 (76,2 %)
Kvinner	119 (27,2 %)	104 (23,8 %)
Gj.snitt alder ± SD	63,5 ±10,2	63,5 ±7,1
Median alder	65	60
Røykevaner		
Antall sigaretter per dag		
Gj.snitt (± SD)	15,5 ±8,20	14,6 ±6,3
Median	14,00	15,00
Antall røykeår		
Gj.snitt (± SD)	40,8 ±12,1	42,3 ±8,4
Median	41,00	41
Antall pakke år ¹		
Gj.snitt (± SD)	31,1 ±17,6	31,3 ±15,1
Median	28	29
Histologi		
Adenokarsinom	156 (35,7 %)	
Plateepitelkarsinom	187 (42,8 %)	
Storcellet karsinom	70 (16,0 %)	
NSCLC, ukjent subgruppe	13 (3,0 %)	
Ukjent kreftform	11 (2,5 %)	

¹Pakkeår = antall sig. per dag x antall år / 20.

* p < 0,05, ** p < 0,01 (Ikke-parametrisk Wilcoxon test for forskjeller i median mellom gruppene).

Tabell 3.9 viser røykevaner hos begge kjønn. Både hos lungekreftpasienter og friske kontroller viser det seg at mennene røyker flere sigaretter per dag enn kvinnene. Hos lungekreftpasientene har menn også flere røykeår og pakkeår enn kvinner med kreft.

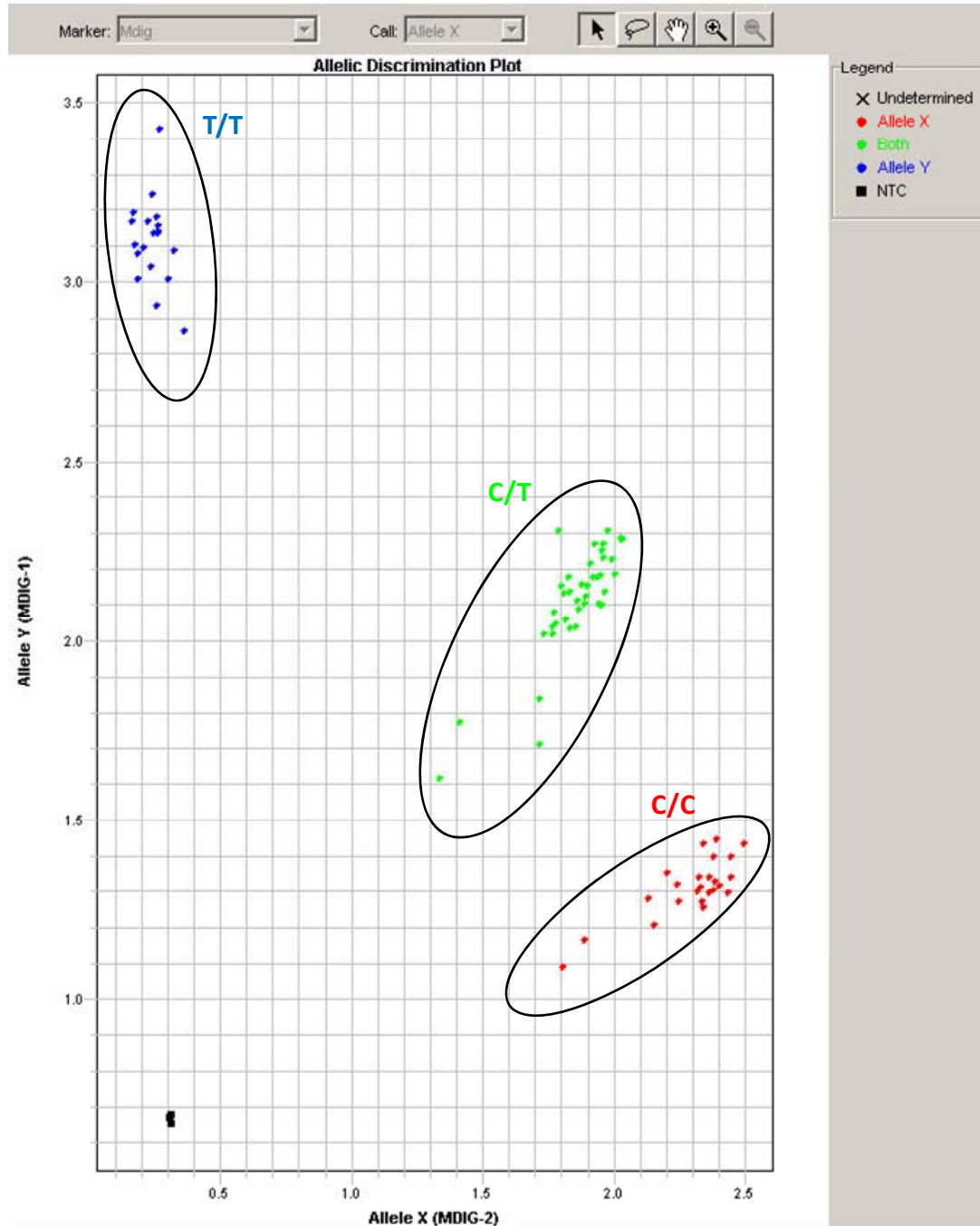
Tabell 3.9 Røykevaner for lungekreftpasienter og friske kontroller gruppert etter kjønn.

	Lungekreft tilfeller		Friske kontroller	
Røykevaner	Kvinner N = 119	Menn N = 318	Kvinner N = 104	Menn N = 333
Antall sigaretter per dag				
Gj.snitt (\pm SD)	13,9 \pm 7,0	15,9 \pm 8,5*	12,3 \pm 5,7	15,4 \pm 6,3*
Median	12,0	14,0	10,0	15,0
Antall røykeår				
Gj.snitt (\pm SD)	35,5 \pm 11,8	42,4 \pm 11,8*	40,1 \pm 7,5	43,0 \pm 8,6
Median	36,0	44,0	40,0	42
Antall pakkeår¹				
Gj.snitt (\pm SD)	24,6 \pm 15,0	33,1 \pm 17,8*	25,3 \pm 13,7	33,1 \pm 15,0
Median	21,0	30,1	20,0	30,8

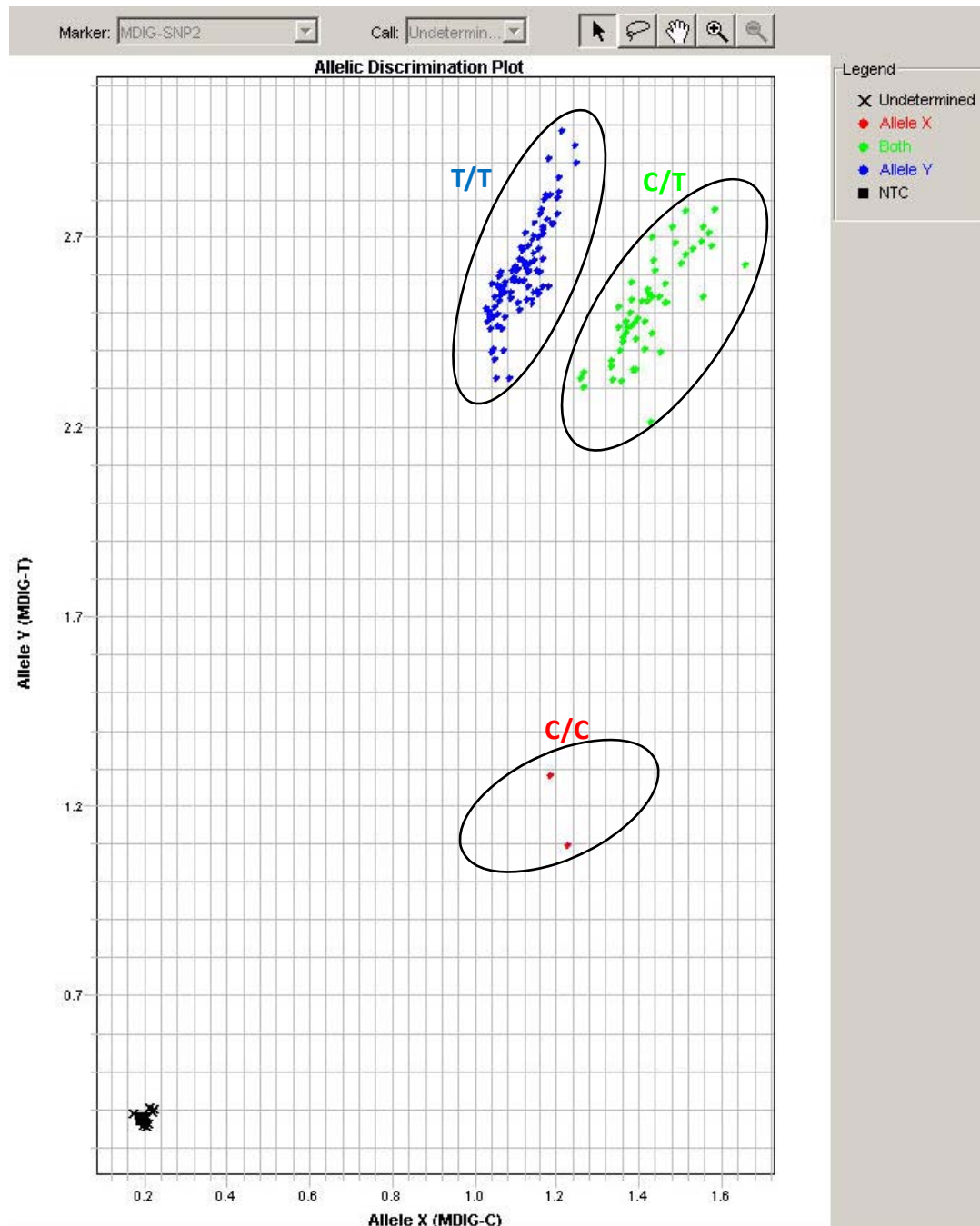
¹Pakkeår = antall sig. per dag x antall år / 20.

* p < 0,05, ** p < 0,01 (Ikke-parametrisk Wilcoxon test for forskjeller i median mellom gruppene).

Genotypingen ble utført ved å bruke TaqMan metoden. For SNP rs699304 ble alle prøvene testet med denne metoden. Det ble utført 10 % repetisjon av prøvene for å se om resultatene stemmer over ens, det var 100 % overensstemmelse. For SNP rs2172257 ble en del av prøvene genotypet med TaqMan mens den andre delen ble genotypet med PCR. Noen (50 prøver) ble testet med begge metoder. Det var god overensstemmelse mellom de to metodene. Figur 3.7 og 3.8 viser eksempler på genotypingen av *Mdig* rs2172257 C/T og *Mdig* rs699304 C/T. Vildtypeallelet er T, mens C allelet er den sjeldne varianten.



Figur 3.7. Eksempel fra TaqMan genotyping data diagram for Mdig rs2172257 C/T. T allel signal fremstilles på Y akse og C allel signalet fremvises på X akse. Blå = T/T, rød = C/C og grønn = C/T. Svart er uten DNA prøve (negativ kontroll).

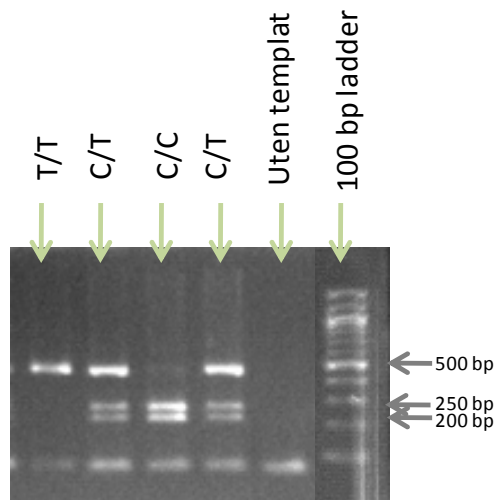


Figur 3.8. Eksempel fra TaqMan genotyping data diagram for Mdig rs699304 C/T. T allel signal fremstilles på Y akse og C allel signalet fremvises på X akse. Blå = T/T, rød = C/C og grønn = C/T. Svart er uten DNA prøve (negativ kontroll).

3.2.2 Genotyping av SNP rs2172257 med PCR

Det ble gjort en PCR metode for SNP rs2172257 på de prøvene som ikke ble testet med TaqMan. 50 prøver ble testet med begge metoder. Dette ble gjort for å bekrefte resultatene fra TaqMan metoden. I PCR metoden ble det brukt primere for å amplifisere et fragment på 468 bp. Dette

fragmentet ble kuttet med restriksjonsenzymet Alu I. Agarose gel elektroforese ble brukt for å separere DNA-fragmentene (Figur 3.9). Homozygote T/T har ikke restriksjonssete og viser bare et bånd på 468 bp. Homozygote C/C har et kuttesete og viser 2 bånd på 259 bp og 209 bp. Heterozygot C/T har et kuttested på C og ikke på T og viser derfor 3 bånd på 259 bp, 209 bp og 468 bp.



Figur 3.9 PCR med SNP rs2172257. Pilene viser båndene på forskjellige genotypene.

3.2.3 Lungekreft risiko forbundet med polymorfier i *Mdig* genet.

Hyppigheten av polymorfier i *Mdig* genet i de to SNPene og deres assosiasjoner med lungekreft (odds ratio) er vist i tabell 3.10. Odds ratio er beregnet fra logistisk regresjon og er justert for alder, kjønn og røykedose. Det var ingen signifikant sammenheng mellom genotypene hos lungekreftpasienter i forhold til friske kontroller. Det viste seg at SNP 2 (rs699304) var en lavfrekvent SNP, hvor vi i vårt materiale ikke detekterte homozygote individer for det sjeldne allelet (C/C)

Tabell 3.10. SNP Mdig (rs2172257) og SNP Mdig (rs699304)

Mdig SNP 1 (Thr/Ala)	Alle lungekreft pasienter	Friske kontroller	OR (95 % CI)*
(rs2172257)			
T/T	113 (26,9 %)	118 (27,9 %)	1 (Referanse)
C/T	229 (54,5 %)	221 (52,2 %)	1,04 (0,75 – 1,45)
C/C	78 (18,6 %)	84 (19,9 %)	1,00 (0,66 -1,52)
Mdig SNP 2 (intron 1)			
(rs699304)			
T/T	281 (66,3 %)	270 (62,8 %)	1 (Referanse)
C/T	140 (33,0 %)	160 (37,2 %)	0,81 (0,60-1,08)
C/C	3 (0,7 %)	0	ND**

*Alle OR-estimerer er justert for alder, kjønn og røyking (pakkeår).

** ND = ikke målt.

Tabell 3.11 og tabell 3.12 viser genotypefrekvensene hos henholdsvis menn og kvinner. Genotype var ikke assosiert med lungekreft verken hos menn eller kvinner.

Tabell 3.11 SNP Mdig (rs2172257) og SNP Mdig (rs699304). Menn.

Mdig SNP 1 (Thr/Ala) (rs2172257)	Lungekreft pasienter	Friske kontroller	OR (95 % CI)*
T/T	83 (26,8 %)	85 (26,1 %)	1 (Referanse)
C/T	170 (54,8 %)	173 (53,2 %)	0,94 (0,64 - 1,38)
C/C	57 (18,4 %)	67 (20,6 %)	0,88 (0,55 – 1,42)
Mdig SNP 2 (intron 1) (rs699304)			
T/T	199 (63,8 %)	205 (62,7 %)	1 (Referanse)
C/T	111 (35,6 %)	122 (37,3 %)	0,84 (0,60 – 1,18)
C/C	2 (0,6 %)	0	ND**

* Alle OR-estimerer er justert for alder, kjønn og røyking (pakkeår).

**ND = ikke målt.

Tabell 3.12. SNP Mdig (rs2172257) og SNP Mdig (rs699304), Kvinner.

Mdig SNP 1 (Thr-Ala) (rs 2172257)	Lungekreft pasienter	Friske kontroller	OR (95 % CI)*
T/T	30 (25,6 %)	33 (33,7 %)	1 (Referanse)
C/T	65 (55,6 %)	48 (49,0 %)	1,42 (0,73 - 2,76)
C/C	22 (18,8 %)	17 (17,3 %)	1,62 (0,68 - 3,87)
Mdig SNP 2 (intron 1) (rs699304)			
T/T	83 (70,9 %)	65 (63,1 %)	1 (Referanse)
C/T	33 (28,2 %)	38 (36,9 %)	0,71 (0,39 – 1,31)
C/C	1 (0,9 %)	0	ND**

*Alle OR-estimerer er justert for alder, kjønn og røyking (pakkeår).

** ND = ikke målt

Tabell 3.13, 3.14 og 3.15 viste ingen sammenheng mellom genotypene i de to SNPene hos lungekreftpasientene og friske kontroller i forhold til de tre kreftformene, adenokarsinomer, platekarsinomer eller storcellet karsinomer. Det var ingen data på C/C for SNP rs699304.

Tabell 3.13. SNP Mdig (rs2172257) og SNP Mdig (rs699304). Adenokarsinom.

Mdig SNP 1 (Thr/Ala) (rs2172257)	Lungekreft pasienter	Friske kontroller	OR (95 % CI)*
T/T	54 (25,5 %)	118 (27,9 %)	1 (Referanse)
C/T	118 (55,7 %)	221 (52,2 %)	1,13 (0,73 – 1,74)
C/C	40 (18,9 %)	84 (19,9 %)	1,11 (0,64 – 1,91)
Mdig SNP 2 (intron 1) (rs699304)			
T/T	153 (70,8 %)	270 (62,8 %)	1 (Referanse)
C/T	62 (28,7 %)	160 (37,2 %)	0,71 (0,48 – 1,04)
C/C	1 (0,5 %)	0	ND**

*Alle OR-estimer er justert for alder, kjønn og røyking (pakkeår).

** ND = ikke målt.

Tabell 3.14. *SNP Mdig (rs2172257) og SNP Mdig (rs699304). Plateepitelkarsinom.*

Mdig SNP 1 (Thr/Ala) (rs2172257)	Lungekreft pasienter	Friske kontroller	OR (95 % CI)*
T/T	50 (27,3 %)	118 (27,9 %)	1 (Referanse)
C/T	97 (53,0 %)	221 (52,2 %)	1,08 (0,69 – 1,69)
C/C	36 (19,7 %)	84 (19,9 %)	1,10 (0,63 – 1,91)
Mdig SNP 2 (introm1) (rs699304)			
T/T	109 (58,9 %)	270 (62,8 %)	1 (Referanse)
C/T	74 (40,0 %)	160 (37,2 %)	0,99 (0,67 – 1,46)
C/C	2 (0,1 %)	0	ND**

*Alle OR-estimerer er justert for alder, kjønn og røyking (pakkeår).

**ND = ikke målt.

Tabell 3.15. *SNP Mdig (rs2172257) og SNP Mdig (rs699304). Storcelletkarsinom.*

Mdig SNP 1 (Thr/Ala) (rs 2172257)	Lungekreft pasienter	Friske kontroller	OR (95 % CI)*
T/T	20 (28,6 %)	118 (27,9 %)	1 (Referanse)
C/T	38 (54,3 %)	221 (52,2 %)	0,93 (0,51 – 1,71)
C/C	12 (17,1 %)	84 (19,9 %)	0,91 (0,42 – 1,98)
Mdig SNP 2 (intron 1) (rs 699304)			
T/T	51 (73,9%)	270 (62,8 %)	1 (Referanse)
C/T	18 (26,1 %)	160 (37,2 %)	0,59 (0,33 – 1,07)
C/C	0	0	ND**

*Alle OR-estimerer er justert for alder, kjønn og røykdose (pakkeår).

**ND = ikke målt.

Fordeling av SNP er i forhold til Mdig ekspresjon i tumorvev

Vi ønsket å vite om noen av de to SNPene i *Mdig* kunne påvirke Mdig proteinets ekspresjon i lungesvulster. Derfor grupperte vi svulstene etter hvilke genotyper de hadde i de to SNP-er. Deretter så vi på proteinekspresjonen i forhold til genotypen av lungekreftpasientene ved å bruke areal og fargeintensitet som beskrevet i første delen av resultat kapitlet. Tabell 3.16 viser sammenhengen mellom Mdig proteinets ekspresjon og pasientenes genotyper. Imidlertid var det ikke noen signifikante sammenhenger mellom protein ekspresjon i lungesvulster og genotypene av pasientene. Dette kan bety at disse SNPene ikke påvirker ekspresjonen av *Mdig* i humant lungevev.

Tabell 3.16 Fordeling av SNP genotyper i forhold til areal og fargeintensitet i IHC.

Parameter	Areal ¹ (%)		Fargeintensitet ² (%)	
SNP	Negativ	Positiv	Negativ	Positiv
SNP 1 (Thr/Ala)				
T/T	7 (15,2)	49 (25,9)	1 (5,6)	55 (25,3)
C/T	29 (63,1)	96 (50,8)	13 (72,2)	112 (51,6)
C/C	10 (21,7)	44 (23,3)	4 (22,2)	50 (23,1)
SNP 2 (intron 1)				
T/T	21 (45,7)	129 (67,5)	7 (41,2)	143 (65,0)
C/T	25 (54,3)	60 (31,4)	10 (58,8)	75 (34,1)
C/C	0	2 (1,1)	0	2 (0,9)

¹Areal: ≤ 20 % = negativ, positiv = 21 % - 100 %. ² Fargeintensitet: negativ = ingen farging, positiv = alle med farging.

4. Diskusjon

Mdig ble i 2005 av Y. Zhang et al [54] vist å induseres av mineralstøv hos gruvearbeidere. Genet er også vist å være oftere uttrykt i lungesvulster og lungekreftceller, men sjeldent i normal lunge hos gruvearbeidere. Det er videre dokumentert at knock-down av *Mdig* med siRNA hemmer G1-S transisjon, noe som tyder på en viktig rolle for *Mdig* i regulering av cellesyklus. I denne artikkelen fremstår det at *Mdig* genet som er blitt identifisert er et nytt gen. Når denne artikkelen er skrevet er funksjonen til *Mdig* genet ikke blitt fullstendig beskrevet. Likevel tyder tilstedeværelsen av flere bevarte domener som er karakteriske for kromatinomformasjon og transkripsjonregulering på at *Mdig* kan være et kjerne protein som er involvert i transkripsjonen. Dette gjør *Mdig* til et interessant kandidat gen å studere i sammenheng med utvikling av kreft i lungene. Når *Mdig* først ble klonet ble det ikke funnet noen rapportert sekvenshomologi. DNA sekvensen av *Mina53* er 99 % identisk med *Mdig*, og dette tyder på at *Mina53* og *Mdig* er ett og samme gen. I denne oppgaven blir *Mina53* genet omtalt som *Mdig* [53].

I flere studier er det blitt undersøkt proteinnivået av *Mdig* i forskjellige kreftformer for å studere betydningen i celleproliferasjon og dens rolle som kreftgen og eventuelt prognosefaktor. Dette er ikke blitt undersøkt i lungekreft. Et av målene med denne oppgaven var å se hvilken betydning uttrykket av proteinet har i lungekreft. Et annet mål med oppgaven var å genotype to SNPer for å avdekke en eventuell assosiasjon med lungekreft. Det er vist i flere undersøkelser at bestemte polymorfier i gener fra signalveier i inflammasjon er assosiert med økt lungekreftisiko og DNA skader [62,63].

4.1 Diskusjon av metodene

4.1.1 Immunhistokjemi

For å få optimale resultater med parafininnstøpte vev bør forbehandlingen av snittene være optimal. Det ble derfor testet to forskjellige buffere; DAKO® Target Retrieval solution pH 9,0 og tris-EDTA pH 9,0. Begge viste gode resultater med marginale forskjeller på disse to bufferne og det ble valgt å bruke tris-EDTA pH 9,0. Tre fortynninger 1:500, 1:1000 og 1:2000 av primærantistoffet ble testet med

den optimale metoden. 1:500 viste akseptabel kjernefarging, men bakgrunnsfargen ble for dominerende. 1:1000 og 1:2000 viste ingen store forskjeller, og begge viste akseptable fargerresultater, mens bakgrunnsfargen var betydelig redusert. Det ble valgt å bruke fortynning 1:000, da den gav de mest optimale resultatene. For å sikre at fargerresultatene var til å stole på ble det brukt kjent positivt lungekreft preparat og en substitusjonskontroll. I tillegg til det kjente positive lungekreft preparatet ble det vurdert å bruke normale bronkiale epitelceller, lymfocytter og makrofager i vevssnittet som intern kontroller, men det ble ikke funnet kriterier for det. Normale bronkiale epitelceller farget positivt når de var til stede i vevet, makrofager farget ikke. Infiltrerende lymfocytter i tumorvevet ga derimot veldig varierende fargerresultater, noen ganger sterkt farget og andre ganger negative. Det er mulig at det er lymfocytter i proliferasjon som er blitt farget som er patogene og mer aggressive. Lungekreftcellene viste varierende fargeintensitet.

4.1.2 Genotyping

Lungekreftpasientene og de friske kontrollene er av norsk opprinnelse og den norske befolkningen er homogen. De vil derfor ligge innen de kriterier som er satt for Hardy-Weinberg likevekt. For at denne likevekten skal være tilstede skal det ikke forekomme innvandring eller utvandring, og individene måtte finne sine partnere tilfeldig. Populasjonen skulle også være tilrekkelig stor slik at det ikke oppstår tilfeldigheter og det får ikke forekomme seleksjon av bestemte gener [57]. Det er i tillegg satt opp parametre som skal være så like som mulig for disse to gruppene, dvs kjønn, alder og røykevaner. For å kvalitetssikre genotypedataene ble 50 prøver for *Mdig* SNP rs2172257 testet med både PCR og Taqman, det var 100 % overensstemmelse mellom de to metodene. Det ble også utført 10 % repetisjon av genotyping med Taqman, det var også 100 % overensstemmelse.

4.2 Diskusjon av resultater

4.2.1 Immunhistokjemi studie av *Mdig* proteinet

Målet med IHC studien var å påvise og kvantifisere ekspresjon av *Mdig* proteinet i vev hos lungekreftpasienter. Vi ønsket å studere om *Mdig* hadde en aktiv rolle i utvikling av kreft og celleproliferasjon. Det ble sett på forskjellen mellom kjønn, alder, røykevaner og histologi mot areal og

fargeintensitet. Det ble også sett på forskjellen mellom kvinner og menn i forhold til alder, røykevaner og ulike kreftformer.

Mdig er et *c-Myc* indusert gen som muligens spiller en aktiv rolle i celleproliferasjon og regulering av celledyklus [53,54]. Det er også studier som tyder på at *Mdig* er et aktivt kreftgen. Teye et al [64] rapporterte at *Mdig* var spesifikt uttrykt i tumorceller fra lymfomer, men i mindre grad i ikke-neoplastiske lymfocytter. Dette kan tyde på at *Mdig* ikke er direkte involvert i grunnleggende mekanismer, men har en aktiv rolle i kreftutviklingen [55,64]. Det er flere studier som tar for seg kreft i tannkjøtt, spiserør, tarm, nyre og nevroblastoma for å undersøke om *Mdig* er relatert til kreftutvikling og celleproliferasjon [56, 65, 66, 67, 68]. Det viste seg at pasienter med spiserørskreft [56], hvor *Mdig* er sterkt uttrykt, har kortere overlevelse i motsetning til *Ki-67* hvor man ikke så noen sammenheng med pasientenes overlevelse. I tannkjøttplateepitelkreft var *Mdig* uttrykt i overensstemmelse med proliferasjon i tumor celler, men i motsetning til spiserørskreft og andre plateepitelkreftformer ikke i forhold til prognose [65]. I disse studiene hvor *Mdig* blir sammenlignet med andre proliferasjonsmarkører som *Ki67* og *PCNA* tyder det på at *Mdig* er en proliferasjonsmarkør. Hos magekreftpasienter viste mutert *p53* signifikant sammenheng med *Mdig* noe som kan tyde på at *Mdig* kan ha en viktig rolle som kreftgen og proliferasjonsmarkør i magekreft. Disse studiene indikerer at *Mdig* kan bli brukt som biomarkør for celleproliferasjon og at det er et kreftgen som kan fungere som en prognosefaktor.

I denne studien ønsket vi å teste om det var eventuelt sammenheng mellom kjønnsfordeling og histologi, med røykedata og alder. Kvinner hadde høyere forekomst av adenokarsinomer, mens plateepitelkarsinomer var mer frekvent hos menn. De ulike histologiene viste signifikante forskjeller i forhold til kjønn. Kvinner med adenokarsinomer var signifikant eldre enn kvinner med storcellet karsinom. Det ble vist at plateepitelkarsinom og storcellet karsinom er sterkere assosiert med røyking enn adenokarsinom. Kvinner med adenokarsinom røykte signifikant mindre enn de med plateepitelkarsinom (røykeår) og storcellet karsinom (sigaretter per dag og pakkeår). Våre resultater bekrefter tidligere funn som har vist at adenokarsinom er mindre knyttet til røykevaner. For menn var det små forskjeller i alder i forhold til de ulike histologitypene. Krefttypene var svakt assosiert med menns røykevaner

hvor menn med storcellet karsinom hadde signifikant færre røykeår enn menn med plateepitelkarsinom.

Det ble observert at *Mdig* proteinet er uttrykt hos 80,4 % av lungekreftpasienter på areal og i fargeintensitet er det 92,5 % som er positive. Lungekreftcellene viste iblant varierende fargeintensitet i samme tumor som kan tyde på ulik aktivitet i cellene. Basale celler var ofte sterkt farget, det er celler i proliferasjon, og dette kan godt passe med det som er blitt publisert at *Mdig* er en proliferasjonsmarkør [55,66,68]. For eksempel i høydifferensierte plateepitelceller så man enkelte ganger at det var sterkere farging i celler som lå nærmest basalmembranen. Det er disse cellene som man oppfatter at prolifrerer mest. Dette kan tyde på at *Mdig* er en proliferasjonsmarkør i lungekreft. I denne studien var det ingen kjønnsforskjeller når man så på areal og fargeintensitet. Alder (over og under 60 år) viste heller ikke forskjell i forhold til areal og fargeintensitet. Det var ingen signifikante forskjeller mellom de ulike kreftformene på fargeintensitet og areal. På fargeintensitet er det ingen forskjell på røykere og ikke røykere. På areal er det en tendens til at ikke-røykere farger mer enn røykere. Det er mulig at areal korrelerer bedre med ekspresjon av *Mdig* enn fargeintensitet. I dette materialet er det svært få ikke-røykere så det er vanskelig å trekke noen konklusjon.

4.2.2 Lungekreftirisiko forbundet med to *Mdig* SNPer

Gener som blir uttrykt i normale celler som er blitt eksponert for mineralstøv er assosiert med inflammatoriske responser [54]. Kronisk inflammasjon er en kjent kofaktor i utviklingen av en rekke lungesykdommer slik som KOLS og kreft. Inflammatoriske responser kan også påvirkes av genotypen. Det er vist assosiasjoner mellom bestemt polymorfismer i sentrale inflammatoriske gener og økt insidens av luftveissykdommer slik som lungekreft [62,63]. Et av målene i denne oppgaven var å studere om genvarianter av, *Mdig* kan påvirke risiko for å utvikle lungekreft. Det ble valgt ut *Mdig* SNP rs2172257 C/T og *Mdig* SNP rs699304 C/T for å avdekke eventuelle assosiasjoner med lungekreft. SNP *Mdig* rs2172257 ble valgt fordi den har en aminosyre forandring Thr[T]385 → Ala[A]. SNPen ligger i ekson 9 og C allelet er det sjeldne allelet. *Mdig* SNP rs699304 C/T ble valgt på grunn av dens posisjon i det første intronet. I denne SNPen er det C som er det sjeldne allelet.

Genotypedata ble analysert for å undersøke om det fantes en sammenheng mellom lungekrefttrisikoen og polymorfiene i denne studien. I tillegg ønsket vi å vite om noen av de to *Mdig* SNPene kunne påvirke *Mdig* proteinets ekspresjon i lungekreft. Derfor grupperte vi negative og positive kreftformer etter hvilken genotype de hadde i de to SNPene. Deretter så vi på proteinekspresjon i forhold til genotypene hos lungekreftpasientene ved å bruke areal og fargeintensitet. Det var ikke signifikante sammenhenger mellom protein ekspresjon i lungesvulstene og genotypene hos lungekreftpasientene. Odds ratio for polymorfiene i de to *Mdig* SNPene viste ingen sammenheng mellom SNPene og lungekreftisiko.

Mdig rs2172257 har en aminosyre forandring Thr[T]385 → Ala[A]. Det var derfor forventet at denne aminosyreforandringen ville være av betydning for krefttrisikoen. Disse aminosyrene har ulik struktur, threonin er polar og alanin er upolar. Denne aminosyre forandringen er en ikke-synonyme (missense) punktmutasjon. Selv om aminosyren forandres, er det ikke sikkert at proteinet mister sin normale aktivitet. Det er avhengig av hvor i proteinet aminosyren sitter. Hvis en upolar aminosyre byttes ut med en polar aminosyre kan det bety mye. Aminosyrebyttet kan derved være at proteinet blir helt inaktivt eller at det er like aktivt som normalt. I denne SNPen virker det som det ikke har noen betydning og at det er ikke blitt en funksjonell forandring.

Mdig SNP rs699304 C/T ble valgt på grunn av dens posisjon i første intronet hvor det muligens er en regulatorisk region og transkripsjonen kan starte. Zhang et al. [54] har vist i et forsøk hvor de analyserte 19 NSCLC cellelinjer med RT-PCR at det var to cellelinjer H441 og H2347 som viste en kortere versjon av *Mdig*. Muligens er dette en alternativ spleising av mRNA i disse cellelinjene som gjør at exon 2 har falt ut av genet. Det er mulig at dette påvirker første intronet og det kan være av betydning i denne SNPen.

5. Konklusjon

IHC viste ingen forskjell på areal og fargeintensitet når det ble sett på de forskjellige parametrene unntatt på areal hvor det viste seg å være tendens til at ikke-røykere farger mer enn røykere. Det er mulig at areal korrelerer bedre med ekspresjon av *Mdig* enn fargeintensitet. I dette materialet er det svært få ikke-røykere så det er vanskelig å trekke noen konklusjon. Våre resultater bekrefter tidligere funn som har vist at adenokarsinom er mindre knyttet til røykevaner. Resultatene fra IHC tyder på at *Mdig* er en proliferasjonsmarkør i lungekreft, og at det i tillegg til å bli ansett som et inflammasjonsgen også har en aktiv rolle i kreftutviklingen. For å kunne bekrefte hvilken rolle *Mdig* genet og *Mdig* proteinet spiller i kreftutvikling og proliferasjon i lungekreft, bør det bli gjort en utvidet studie, hvor man inkluderer andre proliferasjonsmarkører og ser på *p53* i forhold til *Mdig*. I denne studien er det ikke blitt undersøkt om *Mdig* er en prognosefaktor. En bør også analysere overlevelseskurven hos lungekreftpasientene.

Ved TaqMan genotyping er det ikke funnet noen assosiasjoner mellom de analyser som ble gjort i de to *Mdig* SNPene og lungekreft. I utgangspunktet i denne studien ble det gått ut fra at *Mdig* er et inflammatorisk gen. Det kan være av betydning å undersøke også om *Mdig* er uttrykt i normale humane bronkieceller med og uten eksponering for lungekarsinogener. Man vet heller ikke hvilken versjon av proteinet som antistoffet detekterer. Det kunne også vært aktuelt å måle ekspresjonen av *Mdig* med mer nøyaktige metoder som RT-PCR og Westernblotting.

Referanser

1. Lea T. Immunologi og immunologiske teknikker. 3. utgave. Bergen: Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS, 2006.
2. Vyberg M. Anvendt Immunhistokjemi. 7 utgave. København: Odontologisk Bokhandel & Forlag, 2008.
3. Boenisch T. Handbook. Immunochemical staining methods. 3rd edition. California: Dako Corporation, Carpinteria, 2001.
4. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin, 2005; 55: 74-108.
5. Bray F. Cancer in Norway 2007. Kreftregisteret, Institutt for epidemiologisk kreftforskning, 2007.
6. Schwartz AG, Prysak GM, Bock CH, et al. The molecular epidemiology of lung cancer. Carcinogenesis 2007; 28: 507-518.
7. Mollerup S, Berge G, Baera R, et al. Sex differences in risk of lung cancer: Expression of genes in the PAH bioactivation pathway in relation to smoking and bulky DNA adducts. Int J Cancer 2004; 119: 741-744.
8. www.kreftregisteret.no
9. Veglia F, Vineis P, Overvad K, et al. Occupational exposures, environmental tobacco smoke, and lung cancer. Epidemiology 2007; 18: 769-775.
10. Boffeta P, Jouernkova N, Gustavson P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. Cancer Causes Control 1997; 8: 444-472.
11. Steenland K, Stayner L. Silicia, asbestos man-made mineral fibers, and cancer. Cancer Causes Control 1997; 8: 491-503.
12. International Agency for research on Cancer. Chromium, Nickel and Welding. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Vol. 49, IARC Press, Lyon, 1990.
13. Hayes RB. The carcinogenicity of metals in humans. Cancer Causes Control 1997; 8: 371-385.
14. Boffetta P. Epidemiology of environmental and occupational cancer. Oncogene, 2004; 23: 6392-6403.

15. Damjanov I. Pathology for the Health-Related Professions. Pennsylvania: W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1996.
16. www.oncolex.no
17. Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers – a different disease. *Nature Reviews Cancer*. 2007; 7: 778-790.
18. Mountain CF, Carolyn M. Regional lymph node classification for lung cancer staging. *Chest* 1997; 111:1718-1723.
19. Haugen Å. Molekylærbiologisk diagnostikk ved lungekreft. *Tidsskr. Norsk Legeforening* 2005; 125: 3283-3285.
20. Redmond DE. Tobacco and cancer, The first clinical report, 1761. *NEJM* 1970; 282: 18-23.
21. Miljø og helse. Rapport, 9. Oslo, Folkehelseinstituttet, 2003.
22. Klaassen CD. Casarett & Doull's Toxicology-The basic science of poisons. USA: The McGraw-Hill Companies, Inc, 2001.
23. Timbrell J. Principles of Biochemical Toxicology. Third edition. London: T-J International Ltd. Padstow, 2001.
24. Tannock IF, Hill RP, Bristow RG, et al. The basic science of oncology. Fourth edition. USA: McGraw-Hill Professional, 2004.
25. International Agency for Research on Cancer. Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Vol 83., IARC Press, Lyon, 2004.
26. Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1194-1210.
27. Nelson HH, Kelsey KT. The molecular epidemiology of asbestos and tobacco in lung cancer. *Oncogene* 2002; 21: 7284-7288.
28. Lubin JH, Boice JD, Edling C, et al. Lung cancer in radon-exposed miners and estimation of risk from indoor exposure. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 817-827.
29. Seeman J, Dixon M, Haussmann HJ. Acetaldehyde in mainstream tobacco smoke: formation and occurrence in smoke and bioavailability in the smoker. *Chem Res Toxicol* 2002; 15: 1331-1350.
30. Dalsgard ÓJ, Vestbo J. Oxidativt stress og genetiske polymorfisme ved KOLS. *Ukeskr Læger* 2002; 164: 4056-4061.

- 31 SFT: Helse og miljøfarlige kjemikalier, TA-1756. Kort innføring i toksikologi, 2000.
32. Amos CI, Xu W, Spitz MR. Is there a genetic basis for lung cancer susceptibility? Recent Results. *Cancer Res* 1999; 151: 3-12.
33. Vineis P. Individual susceptibility to carcinogens. *Oncogene* 2004; 23: 6477-6483.
34. Spurkland A, Harbo HF. Genetiske analyser i genetisk epidemiologi. *Norsk Epidemiologi* 2002; 12 (2): 89-96.
35. Klaassen CD, Watkins III JB. Casarett & Doull's essentials and toxicology. USA: The McGraw-Hill Companies, Inc, 2003.
36. Hartl DL, Jones WJ. Essential Genetics, a genomics perspective. 4th ed. USA: Jones and Bartlett Publishers, 2006.
37. Alberts B, Johanson A, Lewis J, et al. The molecular Biology of the Cell. London: Garland Science, 2002.
38. Berner A, Bryne M, Thrane PS. Spredning av kreftsvulster. *Tidsskr Nor Legeforen* 1996; 116: 952-957.
39. Singh S, Simon M, Meybohm I, et al. Human breast cancer: frequent p53 allele loss and protein overexpression. *Hum Genet* 1993; 90: 635-640.
40. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
41. Thomposon CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462.
42. Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumor cells. *Nature* 2004; 4: 592-603.
43. Lømo J. Apoptose-nye muligheter i behandling av kreft. *Tidsskr Nor Legeforen* 1998; 118: 3426-3441.
44. Gallin JI, Snyderman R. Inflammation, basic principles and clinical correlates. Third edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999.
45. Adamopoulos S, Parissis JT, Kremastinos DT. A Glossary of circulating cytokines in chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2001; 3: 517-526.

-
46. Azad N, Rojanasakul Y, Vallyatham V. Inflammation and lung cancer: Roles of reactive oxygen/nitrogen species. *J Toxicol Environ Health* 2008; Part B 11: 1-15.
 47. Coussens L, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860-867.
 48. Engels EA. Inflammation in the development of lung cancer: epidemiological evidence. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008; 8:605-615.
 49. Skogstad M, Zeindini S. Inflammasjon gir økt risiko for ulike tilstander også for arbeidsbetingete lidelser. *Ramazzini* 2005; 12(3): 8-10.
 50. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York, USA: Clarendon Press, Oxford University Press, 1985.
 51. Blomhoff R. Antioksidanter og oksidativt stress. *Tidsskr Nor Legeforen* 2004; 124: 1643-1645.
 52. www.bb.iastate.edu B 404 Supplement. Oxidativt stress. Thomas JA. Iowa State University, 1999.
 53. Tsuneoka M, Koda Y, Soejima M, et al. A novel Myc target gene, *Mina53*, that is involved in cell proliferation. *J Biol Chem* 2002; 277, 35450-35459.
 54. Zhang Y, Lu Y, Yuan B-Z, et al. The human mineral dust-induced gene, *Mdig*, is a cell growth regulating gene associated with lung cancer. *Oncogene* 2005; 24: 4873-4882.
 55. Teye K, Tsuneoka M, Arima N, et al. Increased expression of a *Myc* target gene *Mina53* in human colon cancer. *Am J Pathol* 2004; 164: 205-216.
 56. Tsuneoka M, Fujita H, Arima N, et al. *Mina53* as a potential prognostic factor for esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7347-7356.
 57. Sjøberg NO. *Molekylær genetikk. Genteknologi-humant DNA*. 4 utgave. Nesbru: Forlaget Vett & Viten as, 2006.
 58. <http://www3.appliedbiosystems.com/index.htm>
 59. Protocol TaqMan® Gene Expression Assays. (2008) Applied Biosystems.

60. Benestad HB, Laake P. Forskningsmetode i medisin og biofag. Oslo: Gyldendal Norsk Forlag, 2005.
61. www.bio.uio.no/plfys/haa/littav/stat.htm
62. Zienolddiny S, Ryberg D, Maggini V, et al. Polymorphisms of the interleukin-1 β gene are associated with increased risk of non small cell lung cancer. *Int. J Cancer*: 2004; 109: 353-356.
63. Lind H, Zienolddiny S, Ryberg D, et al. Interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphism and risk of lung cancer: A possible interaction with polymorphisms in the interleukin 1 beta gene. *Lung Cancer* 2005; 50: 285-290.
64. Teye K, Arima N, Nakamura Y, et al. Expression of Myc target gene *Mina53* in subtypes of human lymphoma. *Oncology Rep* 2007; 18: 841-848.
65. Kuratomi K, Yano H, Tsuneoka M, et al. Immunohistochemical expression of Mina53 and Ki67 proteins in human primary gingival squamous cell carcinoma. *Kurume Med J* 2006; 53: 71-78.
66. Zhang Q, Hu CM, Yuan YS, et al. Expression of *Mina53* and its significance in gastric carcinoma. *Int J Biol Markers* 2008; 23: 83-88.
67. Fukahori S, Yano H, Tsuneoka M, et al. Immunohistochemical expressions of Cap43 and Mina53 proteins in neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 2007; 42: 1831-1840.
68. Ishizaki H, Yano H, Tsuneoka M, et al. Overexpression of the *myc* gene *Mina53* in advanced renal cell carcinoma. *Pathol Int* 2007; 57: 672-680.

Vedlegg I

Enzymer

Enzym	Produsent	Buffer
DyNAZtne II DNA polymerase	New England biolab	10x reaksjon buffer

Restriksjonsenzymer

Enzym	Produsent	Buffer
Alu I	New England Biolabs	10 x NEBuffer 2

Kit

LABVISION CORPORATION / NEO MARKERS

TaqMan®SNP Genotyping Assays.

AB Applied Biosystems

UltraVision ONE Large Volume Detection System HRP Polymer (Ready to use). REF: TL-125-HLJ. LOT HLJ 80102.

LABVISION CORPORATION

Kitet inneholder: Large volume Ultra V Block. REF TA-125-UB.
UltraVision ONE HRP polymer. TL-125-PHJ.

UltraVision Plus Detection System. DAB Plus Substrate System.
Kitet inneholder: DAB Plus Chromogen . REF TA-004-HCX.
DAB Plus Substrate. REF TA-125-HSX.

LABVISION CORPORATION

Utstyr

Fargeskåler til buffer i mikrobølgeovn: Skåler som tåler mikrobølgeovn. Volum 300 ml.

Lysmikroskop, Nikon Y-THS, Japan. Model Eclipse E 600W. 100-240V, 2.4 A, 50/60 HZ.

Mikrobølgeovn, Whirlpool, VIP 34. Typenummer AVM 215.

Mikrobølge effekt i følgen IEC 705, 1000 g vann. Mikrobølge effekt 1000W

Dimensjoner H*B*D

Yttermål 330*553*477

Ovnstørrelse 227*375*395 34L

Objektglass: Polysine Microslides. Art.No. 041400. (Firma: Mensel-Glässer). Firma Chemi-Teknikk as.

Oppleggsmaskin, Cover-Tech CTM 6. MICROM International BmbH

Pipetter: Eppendorf 1000 µl, 200 µl, 20 µl, 10 µl.
Gilson: 100 µl.

TaqMan instrument

ABI prism 7900 HT sequence detection system

Thermal cyclers

Peltier Thermal Cycler DYAD™ DNA engine 96 wells.

Peltier Thermal Gradient Cycler PTC-200 384 wells

Vedlegg

Kjemikalier

Eddiksyre (iseddik)	Merck
Agarose (SeaKem GTG)	Lonza
Antibody Diluent with Background Reducing Components	DAKO®
Borsyre	Sigma
Bromfenol blå	Chroma-Gesellschaft
Cytoseal™ 60	Bergmann
dNTPs	Quanta
EDTA (Triplex III)	Merck
EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)	Sigma
Etanol p.a (rektifisert, absolutt)	Arcus
Etidiumbromid	Biorad
Forward primer	DNA Technology
HCl	Merck
Hydrogen Peroxidase Block	LAB VISION Corp
Ladder	New England Biolab
Mayer`s Hematoksilin	Chemi-teknikk AS
Mouse anti-MINA53	Invitrogen
NaCl	Merck
Natriumhydrogenfosfat	Merck
Revers primer	DNA Technology
Tris med/Tween 20 buffer	DAKO®
Trizma® base, 99%. (Tris)	Sigma

Løsninger

Alle løsninger er laget med ddH₂O og hvor det kreves at de er sterilfiltrert før bruk.

DAB Plus substrate system

1 dråpe (40µl) av DAB Chromogen, 2 ml DAB Plus Substrate

EDTA 0,5 M disodium dihydrate (ethylenediaminetetraacetic acid) 50 ml

9,3 g EDTA, 50 ml H₂O, pH justert til 8.

PBS (Fosfatbufret salin)

7,07 g NaCl, 0,20 g KCl, 1,94 g NaHPO₄ · H₂O, 1,04 ml 0,12 % fenol rødt, H₂O til 1 l.

Tris-EDTA buffer pH 9.0

6 gr. Tris, 1,85 gr. EDTA, 5 liter ddH₂O..

Tris med/Tween 20 Buffer. DAKO® Wash buffer x10.

100 ml Wash buffer, 900 ml ddH₂O. pH 7,6 +/-0,1).

TAE buffer (Tris-acetate-EDTA buffer) 50 X, 1L

242 g Tris base, 57,1 ml iseddik, 100 ml 0,5 M EDTA pH 8.

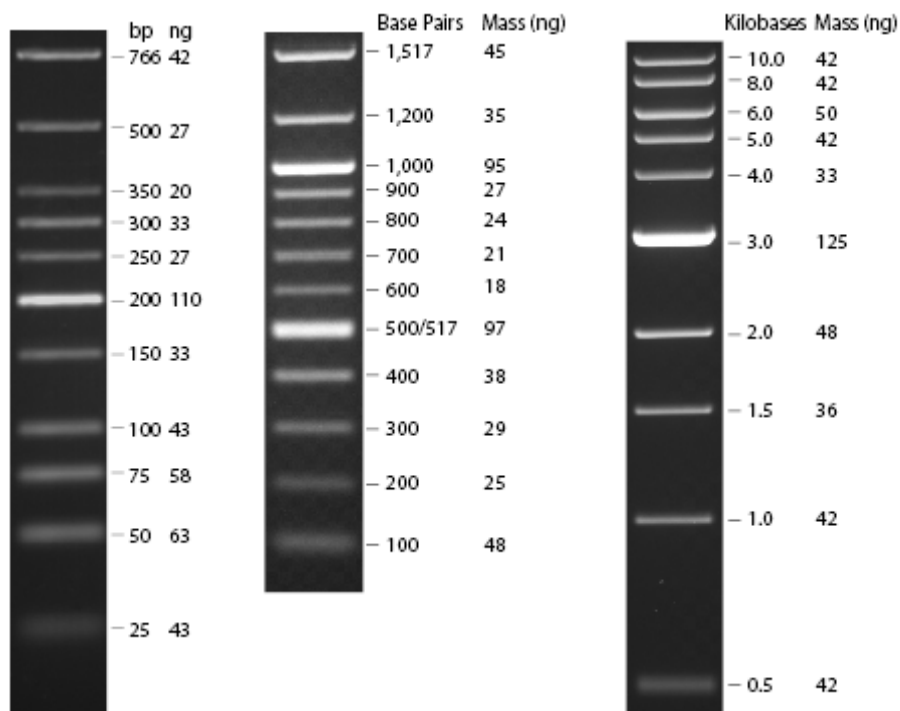
TBE buffer (Tris-borate-EDTA buffer) 5 X , 1L

54 g Tris base, 27,5 g borsyre, 20 ml 0,5 M EDTA pH 8.

TE buffer (Tris-EDTA buffer) 10 X, pH 8

100 mM Tris-Cl pH 8, 10 mM EDTA pH 8.

Lav molecular DNA laddere, henholdsvis 100 bp og 1kb ladders.



Vedlegg II

Biobank på STAMI for lungekreft studier.

I denne oppgaven er det brukt DNA prøver og lungekreftprøver fra Biobanken på Statens arbeidsmiljøinstitutt (STAMI). Biobanken består av 437 individer som er født i Norge og av norsk herkomst. De er blitt diagnostisert med NSCLC og tatt inn til kirurgi ved universitetssykehusene i Oslo og Bergen i årene 1986 og 2002. Friske kontroller er hentet fra HUBRO prosjektet (en allmenn helseundersøkelse) som ble foretatt i 2000-2002 av befolkningen i Osloområdet. De friske kontrollene i denne studien er valgt ut etter følgende kriterier: (i) 59 år og eldre; (ii) har røykt mer enn 5 sigaretter per dag; (iii) er røykere eller sluttet for mindre enn 5 år siden. Disse 437 friske kontrollene ble tilfeldig valgt ut og tilpasset lungekreft pasientene på alder, røykedose og kjønn. Fra de friske kontrollene og lungekreftpasientene er det blitt isolert DNA fra blod og normalt lungevev. Fra lungekreftpasientene er det blitt fiksert vev og laget parafinblokker som er brukt i histologi og immunhistokjemi.